

**Untersuchungen zur
teratogenen Wirkung von Doxycyclin
Polyvinylpyrrolidon und physiologischer
Kochsalzlösung nach Anwendung der
Dottersackmethode bei Kaninchen**

HANS-WILLI BREUER

Düsseldorf 1975

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026



Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. G. R ö h r b o r n)

UNTERSUCHUNGEN ZUR TERATOGENEN WIRKUNG VON DOXYCYCLIN,
POLYVINYLPIRROLIDON UND PHYSIOLOGISCHER KOCHSALZLÖSUNG
NACH ANWENDUNG DER DOTTERSACKMETHODE BEI KANINCHEN

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Hans-Willi Breuer

1975

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.:

Prof. Dr. Schadewaldt

Referent

gez.:

Prof. Dr. Röhrborn

Korreferent

gez.:

Prof. Dr. Ohnesorge

MEINEN ELTERN

GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. EINLEITUNG	3
2. LITERATURÜBERSICHT	4
2.1 Entwicklung der Tetracycline und ihre Wirkungsweise	4
2.2 Teratologische Untersuchungen mit Tetracyclinen nach direkter Appli- kation	7
2.2.1 Sand Dollar-Echinarachnius parma	7
2.2.2 Vogel	8
2.3 Teratologische Untersuchungen mit Tetracyclinen an Säugetieren	9
2.3.1 Maus	9
2.3.2 Ratte	10
2.3.3 Kaninchen	13
2.3.4 Hund	14
2.4 Zusammenfassung der wichtigsten Tierexperimente zur Teratogenität der Tetracycline	14
2.5 Teratogene Wirkungen von Tetracyc- linen beim Menschen	19
2.6 Untersuchungen zur Wirkung von Tetracyclinen auf die Knochen- und Zahnentwicklung	22
3. METHODENDISKUSSION	26
3.1 Wahl des Versuchstieres	26
3.2 Wahl der Applikationsart	27
3.2.1 Indirekte Applikation	28
3.2.2 Direkte Applikation am Säuge- tier und geschichtlicher Überblick	30
3.3 Diskussion der für teratologische Testmethoden bedeutsamen Parameter ...	35

E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N
=====

4.	D I E D O T T E R S A C K M E T H O D E U N D I H R E A N W E N D U N G	38
4.1	Darstellung der Dottersackmethode ...	39
4.2	Testung von Doxycyclin, Polyvinyl- pyrrolidon und physiologischer Kochsalzlösung mit der Dottersack- methode	43
4.3	Grundzüge der Embryogenese des Kaninchens unter besonderer Berück- sichtigung des neunten Tages	45
5.	V E R S U C H S E R G E B N I S S E	56
6.	D I S K U S S I O N	77
7.	Z U S A M M E N F A S S U N G	82
8.	L I T E R A T U R	84

1. EINLEITUNG

Über Tetracycline hat es seit ihrer Entdeckung (DUGGAR, 1948) zahlreiche Publikationen gegeben, die sich mit der Teratogenität dieser Antibiotika beschäftigen. Insgesamt ergeben diese Arbeiten jedoch kein klares Bild über eine mögliche teratogenen Wirkung der Tetracycline. Die Ergebnisse variieren von "nicht teratogen" über "Wachstumshemmung" bis "eindeutig teratogen". In diesen teratologischen Untersuchungen wurden herkömmliche Applikationsformen (i.v., i.m., i.p. und oral) verwandt. Bisher wurden noch keine direkten Untersuchungen mit Tetracyclinen am Säugerembryo durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Doxycyclin, Polyvinylpyrrolidon und physiologische Kochsalzlösung auf Teratogenität nach direkter Applikation in den Dottersack von Kaninchenembryonen untersucht.

2. L I T E R A T U R Ü B E R S I C H T

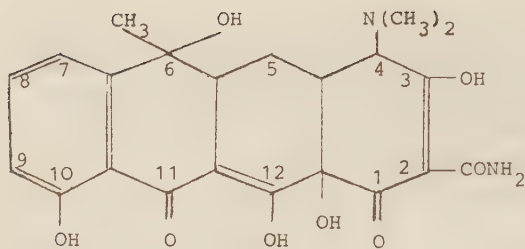
Die Tetracyclinentwicklung und die wesentlichen Arbeiten zur Teratogenität der Tetracycline sind dargestellt.

2.1 Entwicklung der Tetracycline und ihre Wirkungsweise

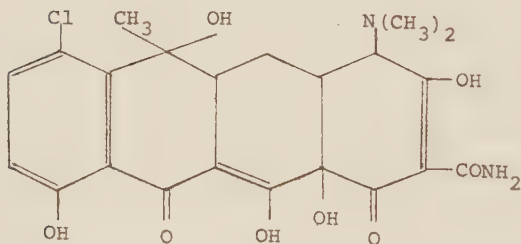
Auf der Suche nach einem neuen Antibiotikum isolierte DUGGAR 1948 Chlortetracyclin (Chlor-TC) aus *Streptomyces aureofaciens*. Im gleichen Jahr wurde Chlor-TC als Breitbandantibiotikum mit dem Namen AUREOMYCIN in die Therapie eingeführt. 1950 folgte das Oxytetracyclin (Oxy-TC), ein dem Chlor-TC in seiner Wirkung entsprechendes Pharmakon, welches aus *Streptomyces rimosus* gewonnen wurde. WOODWARD und STEPHENS entwickelten 1952 (ANONYMUS) für beide Antibiotika die Strukturformeln, die sich nur durch ein Chloratom bzw. eine Hydroxylgruppe unterscheiden (Abb. 1). 1952 gelang es, aus Chlor-TC das Tetracyclin (TC) zu synthetisieren. Erstmals war somit in der Geschichte der pharmazeutischen Forschung ein Antibiotikum primär nach einer vorliegenden Strukturformel entwickelt worden. 1959 wurde die Tetracyclingruppe durch Demethylchlortetracyclin (Demethylchlor-TC) erweitert (JOHNSON, 1964).

Auch die später noch gefundenen Antibiotika der Tetracyclinreihe unterscheiden sich chemisch nur durch ihre Substituenten, z.B. an dem C₂, C₄, C₇, C₉, C_{11a} und C_{12a} Atom (HLAVKA und BOOTH, 1973). Diese beeinflussen lediglich die spezifische Pharmakokinetik (Resorption, Eiweißbindung, Halbwertszeit und Elimination). Die verschiedenen Tetracycline (Abb. 1) sind in ihrer Wirksamkeit gegenüber zahlreichen gramnegativen und grampositiven Erregern untereinander gleich (KUSCHINSKY und LÜLLMANN, 1974).

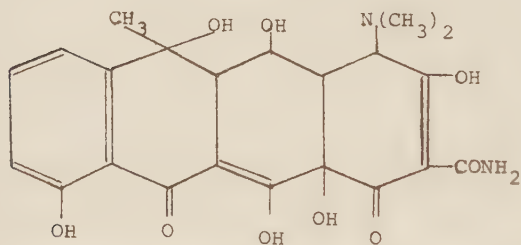
Der mikrobielle Metabolismus wird durch Hemmung oder Änderung der Proteinsynthese am bakteriellen Ribosom (KNOTHE, 1974), der Phosphorylierung und der Glutamat-Oxydation (HOBBY, 1950) gestört. Dadurch wird ein bakteriostatistischer Effekt erreicht.



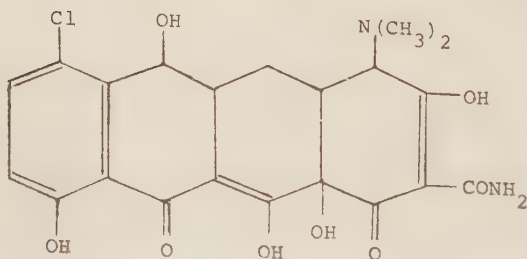
TETRACYCLIN



CHLOR-
TETRACYCLIN



OXY-
TETRACYCLIN



DEMETHYL-
CHLOR-
TETRACYCLIN

Abbildung 1: Strukturformeln von Tetracyclin, Chlor-tetracyclin, Oxytetracyclin und Demethylchlortetracyclin

2.2 Teratologische Untersuchungen mit Tetracyclinen nach direkter Applikation

Die im folgenden beschriebenen Untersuchungen beschäftigen sich mit den teratogenen Wirkungen der Tetracycline nach direkter Applikation. Direkte Applikation bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die untersuchte Substanz direkt auf dem Embryo einwirkt. Der mütterliche Organismus und die Plazenten sind dadurch in ihrer möglichen Wirkung auf die applizierte Substanz umgangen.

2.2.1 Sand Dollar-Echinarachnius parma

Zur Klärung des Wirkungsmechanismus, der möglicherweise für die Mißbildungsentstehung nach Tetracyclinapplikation verantwortlich ist, trägt eine Arbeit von BEVELANDER et al. (1960) bei. In jeder Versuchsserie wurden ungefähr 100 befruchtete Eier von Echinarachnius parma in 16° C warmes Meerwasser gebracht. Durch Zusatz von TC wurden Konzentrationen von 8 - 15 mg %, 20 - 25 mg % und 40 mg % erreicht. Bei der niedrigsten Konzentration (8 - 15 mg %) traten geringe Wachstumshemmungen auf. Bei der mittleren Konzentration (20 - 25 mg %) wurden darüber hinaus Fehldifferenzierungen beobachtet, Konzentrationen über 40 mg % verursachten einen Mitosestop und ausgeprägte Entwicklungsstörungen. Zusatz von Calcium-Ionen erhöhte die Mitoserate, konnte aber auch in der vierfachen physiologischen Konzentration die Hemmwirkung von TC nicht vollständig unterdrücken. Eine Verwendung von Magnesium als Antidot gegen die beschriebene teratogene Wirkung des Antibiotikums blieb erfolglos.

2.2.2 Vogel

1959 applizierten BEVELANDER et al. 0,1 - 2,5 mg TC in den Dottersack von acht Tage alten Hühnchenembryonen. Die Embryonen wurden 2, 4, 6 bzw. 8 Tage nach TC-Gabe untersucht. Nach Injektion der höchsten Dosis konnte eine generalisierte Wachstumsverzögerung an diesen Embryonen beobachtet werden. Mikroskopisch wurden ein verdicktes Periost, eine verzögerte Knorpelbildung und eine deutlich verringerte Femurverkalkung festgestellt. Diese Veränderungen führten zur Bildung von deformierten Knochen.

1960 erweiterten BEVELANDER et al. die bereits dargestellten Experimente am Hühnchenembryo durch Gabe von höheren Dosen. Stets konnte 24 h nach der TC-Applikation das Antibiotikum durch Fluoreszenz im UV-Licht im gesamten Skelett nachgewiesen werden. Im Dosisbereich von 0,1 - 0,5 mg TC traten keine deutlichen Ossifikationsstörungen auf. 2,5 - 5 mg TC-Injektionen führten jedoch zu den bereits 1959 von BEVELANDER et al. beschriebenen Symptomen.

Am 14. Inkubationstag applizierte OWEN (1962) 0,1 mg TC Vogelfeten intravenös. Nach 5, 30 oder 60 min wurden einzelne Knochen im UV-Licht mikroskopisch untersucht. Bereits 5 min nach der Injektion konnte eine gelbe Fluoreszenz im Knochengewebe nachgewiesen werden.

1964 untersuchte TUBARO Demethylchlor-TC, TC, Chlor-TC und Chlormethylencyclin auf Teratogenität bei Hühnchenembryonen, Wistar Ratten (s. 2.3.2) und Kaninchen (s. 2.3.3). Einzeldosen von 1 mg des jeweiligen Antibiotikums wurden am 8. Inkubationstag den Hühnchenembryonen in den Dottersack injiziert. Die so behandelten Embryonen zeigten am deutlichsten nach Applikation von Demethylchlor-

TC und Chlor-TC eine Gewichtsreduktion gegenüber den Kontrolltieren. Nach Demethylchlor-TC-Behandlung waren 91,6 % der Embryonen mißgebildet, nach TC-Gaben 63,6 %, nach Chlor-TC-Gaben 41,6 % und nach Chlormethylencyclin 8,2 %. Die Mißbildungsfrequenz in der Kontrollserie betrug 8,3 %. Die UV-Fluoreszenz dieser Antibiotika im Knochen war unterschiedlich stark ausgeprägt.

2.3 Teratologische Untersuchungen mit Tetracyclinen an Säugetieren

In den folgenden Untersuchungen wurde das jeweilige Tetracyclin den trächtigen Muttertieren appliziert. Somit konnte die Substanz erst über den mütterlichen Kreislauf den Embryo bzw. Feten erreichen.

2.3.1 Maus

Neun Jahre nach der Entdeckung des Chlor-TC (DUGGAR, 1948) beschrieben FILIPPI und MELA (1957) teratogene Wirkungen nach TC-Applikation bei der Maus. In einer 1. Versuchsserie verabreichten sie weißen Mäusen vom 5. bis 20. Tag der Gestation 5 mg/kg/die TC oral. Die 2. Serie wurde ebenso behandelt, nur gaben die Autoren zusätzlich Vitamin-B-Komplex. Als häufigste Mißbildungen traten in der 1. Versuchsgruppe Palatoschisis mit Mandibulahypoplasie, Syndaktylie und Verkürzung der distalen Extremitäten auf. Im Gegensatz hierzu wurden keine teratogenen Veränderungen in der 2. Versuchsgruppe gefunden. Durch den Zusatz von Vitamin-B-Komplex konnte das Auftreten von Mißbildungen verhindert werden.

BOUCHER und CARTERET (1965) applizierten in einer 1. Versuchsserie 250 mg/kg/die TC-hydrochlorid trächtigen Mäusen vom 10. bis 18. Tag der Gestation. In einer 2. Ver-

suchsserie wurden die Muttertiere auf gleiche Weise behandelt. Die Jungtiere erhielten jedoch zusätzlich vom 17. bis 23. Tag post partum 50 mg/kg/die TC-hydrochlorid. Die Neugeborenen beider Serien wogen ca. 20 - 25 % weniger als die Tiere einer Kontrollserie; die Letalität am ersten Tag post partum war um 20 % gegenüber der Kontrolle erhöht. Der Gewichtsrückstand wurde in der 1. Gruppe bis zum 17. Tag aufgeholt, in der 2. Gruppe konnte während der fortgesetzten TC-Applikation die Entwicklung auch weiterhin gehemmt werden.

2.3.2 Ratte

BEVELANDER und COHLAN führten 1962 eine experimentell teratologische Untersuchung mit TC-hydrochlorid an Wistar Ratten durch. Sie injizierten den Muttertieren 40 - 80 mg/kg vom 12. bis 20., vom 8. bis 15. und vom 10. bis 15. Tag der Gravidität intramuskulär. Neben der charakteristischen TC-Fluoreszenz im UV-Licht konnten eine deutliche Gewichts- und Längenabnahme der Feten beobachtet werden. 40 mg/kg/die vom 8. bis 15. und vom 10. bis 15. Tag appliziert, führten zu einem mittleren Fetengewicht von 2,6 g. Der Kontrollwert lag bei 3,6 g. Die gleiche Dosis TC-hydrochlorid vom 12. bis 10. Tag appliziert, führte hingegen zu einem durchschnittlichen Gewicht von 3,3 g. Die kritische Zeitspanne für eine Beeinflussung des Gewichts durch TC-hydrochlorid dauert somit bei der Ratte vom 10. bis 12. Tag p.c.

Langzeitstudien der Lederle Laboratorien zeigten, daß Chlor-TC in 100facher therapeutischer Dosis weder Einfluß auf die Fertilität von Ratten hatte, noch irgendwelche Mißbildungen verursachte (MENNIE, 1962).

HURLEY und TUCHMANN DUPLESSIS (1963) verabreichten täglich 150 - 200 mg TC-hydrochlorid trächtigen Wistar Ratten während der ganzen Schwangerschaft. Diese Menge entspricht ungefähr der 60 - 100fachen therapeutischen Dosis. Trotz dieser hohen Dosis waren alle Jungtiere in ihrem Gewicht und in ihrer Erscheinung normal. Obwohl ein verlangsamtes postnatales Wachstum beobachtet wurde, fanden sich keine Hinweise für Teratogenität von TC-hydrochlorid bei der Ratte.

TUBARO verwandte 1964 für seine teratologischen Experimente ebenfalls Wistar Ratten. Ihnen wurden 10 mg/kg Demethylchlor-TC, TC, Chlor-TC und Chlormethylencyclin vom 10. bis 20. Tag der Gestation intravenös injiziert. Die Jungtiere der verschieden behandelten Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede im Gewicht. Mißbildungen traten nicht auf. Die UV-Fluoreszenz war nach TC und Demethylchlor-TC Applikation am intensivsten ausgeprägt.

TC-hydrochlorid wurde bereits drei Tage vor der Paarung männlichen und weiblichen Sprague-Dawley Ratten oral zugeführt (MC COLL et al., 1965). Diese Behandlung wurde bei den weiblichen Tieren während der gesamten Gravidität mit 500 mg/kg TC-hydrochlorid fortgesetzt. Es konnte nur ein gehäuftes Auftreten von Hydroureteren als Folge der Behandlung festgestellt werden.

1968 testeten SAVINI et al. Oxy-TC auf seine Teratogenität bei Ratte, Kaninchen (s. 2.3.3) und Hund (s. 2.3.4). Am 7. Tag p.c. wurde bei der Ratte die erste intramuskuläre Injektion durchgeführt. Die Implantationszahl wurde an diesem Tag während einer Laparotomie bestimmt. Anschließend wurde täglich Oxy-TC zu einer Dosis von 41,5 mg/kg bis zum 18. Tag p.c. injiziert. Die Auswertung der Ergebnisse ergab in den Parametern Gewicht, Resorptionen

und Mißbildungen keine Hinweise auf eine teratogene Wirkung.

CAHEN und FAVE (1970) applizierten 25, 50 und 250 mg/kg/die Doxycyclin Wistar Ratten vom 7. bis 16. Tag der Gestation. Am 21. Tag p.c. wurden die Ratten getötet, und Doxycyclin ließ sich durch UV-Fluoreszenz in den Feten nachweisen. In einer 2. Serie wurde die Behandlungsdauer auf den Zeitraum vom 1. bis 18. Tag p.c. ausgedehnt. Die applizierten Dosen variierten von 6,25 - 200 mg/kg/die. Obwohl sich das Antibiotikum als plazentargängig erwies, konnten die Autoren keine teratogenen Wirkungen von Doxycyclin beobachten. In der Versuchsauswertung achteten sie auf Mißbildungen, Resorptionen, abgestorbene Feten und auf das Gewicht der Jungtiere.

DETYUK et al. (1971) stellten nach Gabe von 50 und 85 mg/kg/die TC-hydrochlorid in der Zeit vom 7. bis 15. Gestationstag bei Albino Ratten einen toxischen Effekt auf die Embryogenese fest. Dieser äußerte sich in einer Wachstums- und Entwicklungshemmung, die bis zum Absterben der Embryonen führte. Ein leichter teratogener Effekt wurde beobachtet.

KIRYUSCHENKOV und SKOSYREVA (1972) applizierten vom 9. bis 15. Tag p.c. Ratten 25 und 100 mg/kg/die TC. Sie beschrieben eine verzögerte Entwicklung der Feten und ihrer Plazenten. In vitro verursachte TC embryotoxische Wirkungen, wenn seine Konzentration 10 mg/ml im Kulturmedium erreichte.

Vergleichsuntersuchungen von TC, TC-hydrochlorid und Oxy-TC führten SZUMIGOWSKA-SZRAJBER und JESKE (1973) an Wistar Ratten durch. TC wurde in Dosen von 540, 270 und 54 mg/kg oral vom 7. bis 21. Tag p.c. verabreicht, TC-hydrochlorid

in 400, 200 und 40 mg/kg Dosen und Oxy-TC in Dosen von 480, 240 und 48 mg/kg. Die behandelten Feten hatten im Vergleich zu einer Kontrollserie ein geringeres Durchschnittsgewicht; die Resorptionsrate war in allen Versuchsserien erhöht. Eine Korrelation zwischen den unterschiedlichen Dosen und der Resorptionsrate konnte jedoch nicht gefunden werden.

2.3.3 Kaninchen

TUBARO (1964) injizierte intravenös jeweils 10 mg/kg/die Demethylchlor-TC, Chlor-TC, TC und Chlormethylencyclin trächtigen Kaninchen vom 10. bis 20. Tag der Gestation. Es wurden keine Mißbildungen festgestellt; die Unterschiede im mittleren Fetengewicht waren bei einem Vergleich der Versuchsserien nicht signifikant. Nach TC und Demethylchlor-TC-Injektion war die stärkste Fluoreszenz im UV-Licht zu erkennen.

Oxy-TC wurde in einer Dosis von 41,5 mg/kg/die trächtigen Kaninchen vom 10. bis 28. Tag p.c. intramuskulär injiziert (SAVINI et al., 1968). Am 10. Tag p.c. wurde eine Laparotomie zur Feststellung der Implantationszahl durchgeführt. Die Resorptionsrate war in den behandelten Tieren doppelt so hoch wie in der Kontrolle.

Am neunten Tag der Gestation untersuchten GROTE und MICAH (1971) an Bastardkaninchen die Wirkung von Pyrrolidinomethyl-tetracyclin in einem Dosisspektrum von 30 - 230 mg/kg nach intraperitonealer, intravenöser und kombinierter Applikation. Nach der Geburt wurden die Jungtiere getötet und präpariert. Es wurden keine Skelettfehlbildungen festgestellt. Da die verwandten Versuchsgruppen zu klein für statistische Betrachtungen sind, ist es nicht möglich, retrospektiv Korrelations- und Regressionsuntersuchungen

zwischen der Wurfgröße und der jeweiligen Dosis durchzuführen. Aus den Ergebnissen könnte man einen negativen Zusammenhang zwischen der Dosis und der Wurfgröße, d.h. den nicht resorbierten Feten, vermuten, was sich aus dem genannten Grund jedoch nicht sichern läßt.

2.3.4 Hund

Ergänzend zu ihren Untersuchungen an Ratten (s. 2.3.2) und Kaninchen (s. 2.3.3) behandelten SAVINI et al. (1968) Hunde vom 18. bis 48. Tag p.c. mit einer täglichen Dosis von 20,75 mg/kg Oxy-TC. Zur Bestimmung der Implantationszahl wurde eine Laparotomie am 18. Tag p.c. durchgeführt. Oxy-TC verursachte eine deutlich erhöhte Mißbildungs- und Resorptionsrate, wohingegen in der Kontrollserie keine Fehlbildungen und Resorptionen auftraten.

2.4 Zusammenfassung der wichtigsten Tierexperimente zur Teratogenität der Tetracycline

Tabelle 1:

Legende:	TC	=	Tetracyclin
	Chlor-TC	=	Chlortetracyclin
	Oxy-TC	=	Oxytetracyclin
	Demethyl- chlor-TC	=	Demethylchlortetracyclin
	-	:	keine Angaben der Autoren zum betreffenden Parameter
	↑	:	Anstieg des betreffenden Parameters
	↓	:	Abfall des betreffenden Parameters
	?	:	keine Angaben der Autoren zur Applikationsart

AUTOR	TIER	SUBSTANZ	DOSES	ZEIT	APPLIK.	MISSB.	RESORT.	GEW.	GRÖSSE
BEVELANDER et al. 1960	ECHINARACH NIUS PARMA	TC	8-15mg% 20-25mg% 40mg%		MEER- WASSER	- ANOMALIE	- -	- -	↓ ↓ MITOSESTOPP
BEVELANDER et al. 1959	HÜHNCHEN EMBRYO	TC	0,1-2,5mg	8. Tag	DOTTER- SACK	SKELETT	-	-	↓
BEVELANDER et al. 1960	HÜHNCHEN EMBRYO	TC	0,1-0,5mg 2,5-5mg	8. Tag	DOTTER- SACK	NORMAL SKELETT	- -	- -	NORMAL ↓
TUBARO 1964	HÜHNCHEN EMBRYO	DEMETHYL- CHLOR-TC TC	1mg 1mg	8. Tag	DOTTER- SACK	SKELETT (91,6%) SKELETT (63,6%) SKELETT (41,6%) NORMAL	↓ ↓ ↓ -	↓ ↓ ↓ -	- - - -
FILIPPI UND MELA 1957	MAUS	TC	5mg/kg	5.-20.T.	ORAL	SKELETT	-	-	-
BOUCHER UND CARTERET 1965	MAUS	TC-HYDRO- CHLORID	250mg/kg	10.-18.T.	?	-	-	↓ 20%	-

AUTOR	TIER	SUBSTANZ	DOSIS	ZEIT	APPLIK.	MISSB.	RESORPT.	GEW.	GRÖSSE
SAVINI et al. 1968	RATTE	OXY-TC	41,5mg/kg	7.-18.T.	i.m.	NORMAL	NORMAL	NORMAL	-
CAHEN UND FAVE 1970	WISTAR RATTE	DOXYCYCLIN	25mg/kg	7.-16.T	?	NORMAL	NORMAL	NORMAL	-
			50mg/kg			NORMAL	NORMAL	NORMAL	-
			250mg/kg			NORMAL	NORMAL	NORMAL	-
			6,25-200 mg/kg	1.-18.T.		NORMAL	NORMAL	NORMAL	-
DETYUK et al. 1971	RATTE	TC-HYDRO- CHLORID	50mg/kg	7.-15.T.	?	LEICHTER TERA- TOGENER EFFEKT	↓	↓	↓
			85mg/kg			LEICHTER TERA- TOGENER EFFEKT	↓	↓	↓
KIRYUSCHEN - KOV UND SKOSYREVA 1972	RATTE	TC	25mg/kg	9.-15.T.	?	-	-	↓	↓
			100mg/kg			-	-	↓	↓
SZUMIGOWSKA SZRAJBER 1973	WISTAR RATTE	TC	540mg/kg	7.-21.T.	ORAL	-	↑	↓	-
			270mg/kg			-	↑	↓	-
			54mg/kg			-	↑	↓	-

AUTOR	TIER	SUBSTANZ	DOSIS	ZEIT	APPLIK.	MITSSB.	RESORPT.	GEW. GRÖSSE
SZUMIGOWSKA SZRAJBER 1973	WISTAR RATTE	TC-HYDRO- CHLORID	400mg/kg	7.-21.T.	ORAL	-	↑	↓
			200mg/kg			-	↑	↓
		OXY-TC	40mg/kg			-	↑	↓
			480mg/kg			-	↑	↓
			240mg/kg			-	↑	↓
			48mg/kg			-	↑	↓
TUBARO 1964	KANINCHEN	DEMETHYL- CHLOR-TC	10mg/kg	10.-20.T.	i.v.	NORMAL	-	NORMAL
		TC	10mg/kg			NORMAL	-	NORMAL
		CHLOR-TC	10mg/kg			NORMAL	-	NORMAL
		CHLORME- THYLEN- CYCLIN	10mg/kg			NORMAL	-	NORMAL
----- SAVINI et al. 1968 ----- GROTE UND MICAH 1971	KANINCHEN	OXY-TC	41,5 mg/kg	10.-28.T.	i.m.	NORMAL	↑	NORMAL
		PYRROLI- DINO- METHYL- TC	30-230 mg/kg			NORMAL	-	-
SAVINI et al. 1968	HUND	OXY-TC	20,75 mg/kg	18.-48.T.	i.m.	SKELETT EINGEWEIDE	↑	-

2.5 Teratogene Wirkungen von Tetracyclinen beim Menschen

Die im folgenden dargestellten Untersuchungen beziehen sich hauptsächlich auf retrospektive Studien an Neugeborenen.

1961 berichteten COHLAN et al. von einem 900 g schweren Neugeborenen, dessen Mutter am Ende ihrer Schwangerschaft drei Wochen lang täglich wegen einer Fruchtblasenruptur mit 1 g TC therapiert worden war. 24 h post partum verstarb das Kind, und die typische TC Fluoreszenz konnte im Skelett durch UV-Licht nachgewiesen werden. Hieraus wird ersichtlich, daß TC im dritten Trimenon plazentargängig ist, und somit die Möglichkeit einer Schädigung des Feten gegeben ist.

WILSON beschrieb 1962 ein Kind mit Mißbildungen an beiden Händen. Die Mutter war während ihrer Schwangerschaft wegen einer Bronchitis mit Breitbandantibiotika behandelt worden. In einer späteren Veröffentlichung von CARTER und WILSON (1962) wurde diese Therapie genauer dargestellt. Von ungefähr dem 33. bis 45. Tag p.c. hatte die Schwangere 12mal 250 mg TC erhalten. Nach dieser Beobachtung und einer vorausgegangenen Warnung von MOYNAHAN (1962) forderten sie, daß Antibiotika der Tetracyclinreihe nicht mehr während der Schwangerschaft gegeben werden sollen.

Für MENNIE (1962) ist CARTER und WILSONs Beobachtung jedoch nur von geringer medizinischer Aussagekraft. Er zitierte in diesem Zusammenhang die bereits dargestellten Langzeitstudien der Lederle Laboratorien an Ratten (s. 2.3.2). Darüber hinaus seien zahlreiche schwangere Frauen mit Tetracyclinen therapiert worden, ohne daß teratogene Wirkungen beschrieben wurden.

Auf die Mitteilung von MENNIE antwortete CARTER (1962) mit dem Vorwurf, daß eine Substanz nicht dann schon als

teratogen abzulehnen ist, wenn sie bei einer einzigen Tierspezies, der Ratte, keine Mißbildungen hervorruft. Zur Begründung seiner Stellungnahme zitierte er Untersuchungen, in denen Thalidomid auch in höheren Dosen keine eindeutig teratogene Wirkung an Hühnchenembryonen, Mäusen, Ratten und Katzen zeigte. Nur das Kaninchen erwies sich als sensibel gegenüber Thalidomid. Tetracycline sollten daher an mehr als nur einer Tierspezies getestet werden.

Scharf verurteilte ARNEIL (1962) CARTERs Antwort auf MENNIEs Mitteilung. Die Mißbildungen an den Extremitäten des Kindes, dessen Mutter während der Schwangerschaft 12mal 250 mg TC erhalten hatte, seien nicht beweisend für die Teratogenität von TC. Die angestellten Vermutungen von CARTER und WILSON über eventuelle teratogene Wirkungen dieser Antibiotika müssen als vage angesehen werden. Außerdem gibt es nach ARNEIL keine Beweise, daß Tetracycline jemals Skelettdeformitäten verursacht haben.

Ähnlich wie ARNEIL reagierte FOZZARD (1962) auf CARTER und WILSONs Ausführungen. Sie stellte den Fall einer Frau dar, die wegen Bronchiektasen zwei Jahre lang täglich 250 mg TC erhalten hatte. Während einer Schwangerschaft wurde die Therapie kontinuierlich fortgesetzt. In der 39. Schwangerschaftswoche wurde diese Frau von einem gesunden und normalen Kind entbunden.

MASON (1962) wies wie CARTER und WILSON auf die Gefahren bei der Anwendung von Tetracyclinen während der Schwangerschaft hin. Die als häufige Nebenwirkung von Tetracyclintherapien beobachteten Zahnverfärbungen müssen als Hinweis für eine Einlagerung dieser Antibiotika in den Knochen angesehen werden.

Postnatale Beobachtungen von COHLAN et al. (1963) an Säuglingen zeigten, daß durch mehrtägige Applikation von 25 mg/kg TC das Skelettwachstum, bestimmt an der Fibula, abnahm. Diese Wachstumshemmung erwies sich nach Beendigung der Therapie als reversibel.

WEINMANN und BRAUN (1969) führten katamnestiche Untersuchungen an 31 Kindern durch, die als Frühgeborene mit Tetracyclinen behandelt worden waren. Diese Kinder zeigten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe keine Unterschiede in Körperlänge, Gewicht, Kopfumfang und in der physiologischen Entwicklung.

Die beiden zuletzt aufgeführten Arbeiten beschäftigen sich nicht direkt mit teratologischen Fragestellungen. Da jedoch die Wirkungen von Tetracyclinen auf die Skelettentwicklung des Säuglings untersucht werden, sind Parallelen zu Tierexperimenten von BOUCHER und CARTERET (1965) gegeben (s. 2.3.1).

TÖTTERMANN und SAXEN (1969) erbrachten an 23 durch therapeutischen Abort erhaltenen menschlichen Embryonen (ca. 20 Tage alt) den Nachweis, daß Tetracycline im 1. Trimenon plazentargängig sind. Die Plazentargängigkeit der Tetracycline wurde durch eine Fluoreszenz im UV-Licht nachgewiesen.

DUNAJ (1974) untersuchte histologisch 180 Embryonen im Alter von 6 bis 12 Wochen. Dabei wurden Embryonen, die von solchen Müttern stammten, die Tetracycline während der Schwangerschaft erhalten hatten, mit einer Kontrollgruppe verglichen. Degenerative Kern- und Cytoplasmaveränderungen traten in den Ossifikationszentren der Embryonen auf, deren Mütter mit Tetracyclinen therapiert worden waren. Die chondrale Ossifikation erschien verzögert,

das Periost war verdickt und die Struktur des Knochengewebes verändert. Störungen im Metabolismus von Glykoproteinen, Polysacchariden und Mucopolysacchariden wurden ebenfalls festgestellt. Nach diesen Beobachtungen forderte DUNAJ, daß keine Tetracyclintherapie mehr bis zum Ende des 4. Schwangerschaftsmonats durchgeführt werden sollte.

2.6 Untersuchungen zur Wirkung von Tetracyclinen auf die Knochen- und Zahnentwicklung

Bereits 1950 berichtete SALTZMAN über eine einfache Methode, Chlor-TC im Blut und Urin nachzuweisen. Durch Verwendung eines Fluoreszenzphotometers (UV-Licht) konnte das Chlor-TC mit einer Abweichung von 10 % quantitativ bestimmt werden. Mit Hilfe der von SALTZMAN zum ersten Mal beschriebenen UV-Fluoreszenz des Chlor-TC, wurden in zahlreichen Untersuchungen Tetracycline im Knochengewebe gefunden.

ALBERT stellte 1953 eine hohe Affinität von Chlor-TC und Oxy-TC zu metallischen Kationen fest.

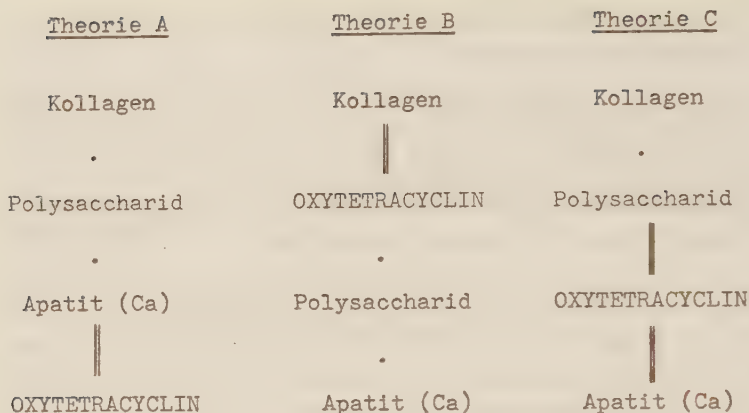
1958 untersuchten MILCH et al. die UV-Fluoreszenz von TC, Chlor TC und Oxy-TC in Knochen von Ratten und Kaninchen. Dosen von 0,1 - 200 mg/kg wurden den Versuchstieren subkutan, intramuskulär, intravenös, intraperitoneal und per os appliziert. Es bestand keine Abhängigkeit der Fluoreszenzverteilung von der Applikationsart. Auch das Geschlecht der Versuchstiere beeinflusste die UV Fluoreszenz nicht, wohl aber das Alter. In den erwachsenen Versuchstieren war die Fluoreszenz im Knochen nicht so ausgeprägt wie bei jungen Tieren. Mikroskopische Untersuchungen der unterschiedlichen Gewebe, ließen aufgrund der Lokalisation der Fluoreszenz auf eine spezifische Affinität der Tetracycline zu proliferierendem Knochengewebe schließen. Eine Interaktion zwischen Kalzium, der Proteinstruktur wachsender

Knochen und dem jeweiligen Tetracyclin schien hierfür verantwortlich zu sein.

Untersuchungen von HARCOURT et al. (1962) an fünf jungen Patienten zeigten, daß im Dentin der Dentes decidui gelbe Linien nach Tetracyclintherapie zu erkennen waren. Das Enamelum war ungefärbt. Die Fluoreszenzmikroskopie erbrachte analoge Ergebnisse, wobei auch hier die Fluoreszenz auf das Dentin beschränkt blieb. Die gleiche Verteilung der gelben Linien fand sich in den Dentes permanentes. Die Annahme einer einfachen Komplexbildung zwischen dem Antibiotikum und Calcium genügt nach HARCOURT et al. nicht, um die dargestellten Phänomene ausreichend zu erklären.

STOREY (1963) unterteilte die Aufnahme von Tetracyclinen im calcifizierenden Knochen in zwei Schritte. Im ersten Schritt erfolgt eine diffuse Aufnahme des Antibiotikums im Knochengewebe; nach einiger Zeit nimmt die beobachtete Fluoreszenz jedoch wieder ab. Im zweiten Schritt wird das Tetracyclin in den randständigen Wachstumszonen konzentriert. Der Knochen behält die nun vorhandene Markierung bis durch physiologische Abbauvorgänge das betreffende Knochengewebe abgebaut und durch neues ersetzt ist.

JOHNSON stellte 1964 drei Theorien über Interaktionsmöglichkeiten von Tetracyclinen im Vergleich zueinander dar. Seine Darstellungen beziehen sich speziell auf Oxy-TC.



Theorie A: Bildung von Oxytetracyclin-Calcium Komplexen an den Kristalloberflächen des Apatits

Theorie B: Bildung von Komplexen zwischen Oxytetracyclin und Kollagen

Theorie C: Oxytetracyclin als Bindeglied zwischen Calcium und Polysacchariden

EGER et al. (1965) erklärten die Tetracyclin-Wirkung im Knochengewebe durch die dritte von JOHNSON dargestellte Theorie. In den Mineralisationszonen von Knochen, in denen sich reichlich freie Calciumionen befinden, tritt auch die Verbindung mit Tetracyclinen ein. Tetracyclinmoleküle bilden mit Calcium ein Chelat und vereinigen sich auch mit Mucopolysacchariden bzw. mit Apatitkristallen zu einem Komplex, der dann fest in das fertige Knochengewebe eingebaut ist (JOHNSON-Theorie C).

1965 erklärte PERRIN die bereits beschriebenen Reaktionen von Tetracyclinen mit Knochengewebe durch einen Komplex zwischen Tetracyclinmolekülen und anorganischen Kristallstrukturen, z.B. dem Hydroxylapatit des Knochens (JOHNSON-Theorie A).

HALME und AER (1968) untersuchten die Wirkung von subkutan appliziertem TC-hydrochlorid nach Injektion von Ca^{45} und C^{14} -Prolin bei trächtigen Ratten. In der fetalen Calvaria waren Ca und Hydroxyprolin vermindert, und die Aktivität von Ca^{45} und C^{14} -hydroxyprolin in den TC-Tieren war signifikant geringer als in den Kontrollen. Die gesamte Aktivität von C^{14} -hydroxyprolin betrug bei den behandelten Feten nur ungefähr 1/3 der Aktivität bei den unbehandelten Tieren. Diese Ergebnisse zeigen, daß TC-hydrochlorid die Ossifizierung von fetalem Knochengewebe und die Biosynthese von Kollagen hemmt. Der Einbau von radioaktiv markiertem Calcium im mütterlichen Knochen konnte durch TC-hydrochlorid nicht beeinflußt werden. Eine wahrscheinliche Erklärung für diese Beobachtung ist die hohe Umsatzrate von Calcium im proliferierenden fetalen Knochen. Im Knochen der ausgewachsenen Ratte ist dieser physiologische An- und Abbau von Knochen nicht so stark ausgeprägt.

KAITILA (1971) schloß sich der bereits von PERRIN (1964) aufgestellten Theorie an; zusätzlich hält er eine Reaktion von Tetracyclinen mit der fibrillären Matrix von Knochen und Zähnen für möglich (JOHNSON-Theorie B).

Trotz unterschiedlicher Methoden und Betrachtungsweisen der biochemischen Aspekte, zeigten die meisten der zitierten Autoren übereinstimmend die Bedeutung von Calcium für die Wirkung von Tetracyclinen im Knochengewebe auf. Auch die Experimente von BEVELANDER et al. (1960) an *Echinarachnius parma* weisen auf die dominierende Rolle von Calcium im Zusammenhang mit der teratogenen Wirkung der Tetracycline hin. Inwiefern Kristallstrukturen (Hydroxylapatit) oder Kollagen für die beobachteten Tetracyclinwirkungen bedeutsam sind, läßt sich aus der vorliegenden Literatur nicht eindeutig ersehen.

3. METHODENDISKUSSION

Teratologische Untersuchungen werden sowohl an verschiedenen Versuchstieren, zu unterschiedlichen Zeitpunkten, als auch nach unterschiedlichen Applikationsarten durchgeführt. Entsprechend vielfältig können dabei die Ergebnisse in ihrer Aussage über die Teratogenität einer untersuchten Substanz ausfallen.

3.1 Wahl des Versuchstieres

Um eine Extrapolation der Ergebnisse auf den Menschen zu erleichtern, empfehlen sich in erster Linie Säuger. Für spezielle Fragestellungen bieten sich allerdings auch andere Tierspezies an. BEVELANDER et al. (1960) konnten bei ihren teratologischen Untersuchungen an der Larve von *Echinarachnius parma* zwar nicht auf die Teratogenität von Tetracyclinen beim Menschen schließen, wohl waren wesentliche Rückschlüsse auf die Interaktionen dieser Antibiotika mit Calcium möglich (s. 2.2.1).

Aus praktischen und finanziellen Erwägungen empfehlen sich für teratologische Untersuchungen Hühnchenembryonen, Ratten, Mäuse, Kaninchen und Hunde.

Der Hühnchenkeim besitzt den Vorteil, daß er leicht in großer Zahl als Versuchstier eingesetzt werden kann. Zudem erwies er sich als sensibel gegenüber Thalidomid (CAHEN, 1964). Die Extrapolation der Ergebnisse auf den Menschen ist jedoch nur begrenzt möglich, da große Unterschiede in der Ontogenese (Plazenta, Dottersack usw.) bestehen. Unlösliche Substanzen in das Ei injiziert können bereits Mißbildungen hervorrufen. Falsch positive Ergebnisse bezüglich der Teratogenität einer Substanz sind dadurch möglich (SOMERS, 1963). Darüber hinaus müssen Substanzen, die in das Ei injiziert werden, dort verweilen, wobei sie bzw. ihre Metaboliten ständig den Embryo beein-

fließen können. Beim Säugerembryo besteht diese absolute Abhängigkeit von einer einmal in den Dottersack oder in die Amnionhöhle applizierten Substanz nicht, da der Embryo mit der Mutter in Verbindung steht.

Unter den Säugetieren erwies sich die Ratte als resistent gegenüber Thalidomid, Cortison und Hydrocortison (CAHEN, 1964). Trotz einfacher Zucht, Haltung und Bestimmung einer bestehenden Gravidität bei der Ratte, werden wegen der allgemein höheren Sensibilität gegenüber exogenen Reizen (z.B. Pharmaka) Mäuse und Kaninchen vielfach bevorzugt.

Die relativ hohe spontane Mißbildungsfrequenz bei der Maus muß als negatives Kriterium im teratologischen Experiment angesehen werden. Dieser Störfaktor läßt sich jedoch durch entsprechend große Kontrollserien erfassen (CAHEN, 1964).

Kaninchen sind höchst sensibel gegenüber zahlreichen teratogenen Agentien. Die vorhandenen Placenta hämochorialis erleichtert die Extrapolation der gefundenen Ergebnisse auf den Menschen.

Ähnlich gute Studien sind möglich bei Verwendung von Hunden als Versuchstiere. Trotzdem sind sie in der teratologischen Forschung bisher nur selten verwandt worden, da ihre Anschaffung und Haltung mit hohen Kosten verbunden ist.

3.2 Wahl der Applikationsart

Hierbei stehen direkte Applikationsarten indirekten gegenüber.

3.2.1 Indirekte Applikation

Im allgemeinen werden in teratologischen Experimenten jene Applikationsformen verwandt, die auch in der klinischen Praxis bei der betreffenden Substanz üblich sind. Dies sind in Bezug auf die Teratologie indirekte Methoden, da die untersuchte Substanz erst über den mütterlichen Organismus und die Plazenta auf den Embryo einwirken kann.

Neben der Dosis ist vor allem der Zeitpunkt, an dem eine Substanz auf den Keim einwirkt, von entscheidender Bedeutung, da die einzelnen Organanlagen und Körperteile sensible Entwicklungsphasen durchlaufen, in denen sie mit maximaler Empfindlichkeit auf eine teratogene Noxe reagieren (GROTE, 1971). Für den Zeitabschnitt zu dem eine Organanlage sich als sensibel erweist, hat SCHWALBE (1906) den Begriff "teratogenetische Determinationsperiode" eingeführt.

Darüber hinaus sind abweichend vom normalen Stoffwechsel zahlreiche Reaktionen in der Schwangerschaft bezüglich ihrer Quantität verändert; so sind z.B. Oxydations- und Reduktionsreaktionen vermindert, wohingegen die Sulfatierungsreaktionen stärker ausgeprägt sind (ERIKSON et al. 1973).

A. Enterale Applikation

Die Teratogenität einer Substanz kann nach enteraler Applikation durch eine Reihe schwer erfaßbarer Faktoren beeinflusst werden.

Die Resorption im Magen-Darm-Trakt kann sowohl aktiv (unter Energieverbrauch) als auch passiv (Diffusion) erfolgen. Interaktionen zwischen der zu untersuchenden Substanz, der Nahrung und den Verdauungssäften sind denkbar.

Genetisch bedingte Unterschiede zwischen den Versuchstieren untereinander und dem Menschen können dabei zum Tragen kommen. Ein zusätzlicher Unsicherheitsfaktor, der gegen eine Substanzapplikation per os spricht, besteht in der Tatsache, daß manche Pharmaka vom Versuchstier nicht bzw. schlecht toleriert werden. Einige Substanzen lassen sich daher nur über einen Katheter applizieren. Dieser kann bei dem Versuchstier Abwehrreaktionen hervorrufen, die über Corticoidausschüttung ihrerseits teratogen wirken können (GOTTSCHESKI und ZIMMERMANN, 1973). Nach erfolgter Resorption kann die zu untersuchende Substanz sowohl über die Pfortader die Leber erreichen und dort metabolisiert werden, als auch indirekt über das Lymphsystem in das Blut gelangen.

Für die teratogene Wirkung einer Substanz ist der Blutspiegel entscheidend. Im Vergleich zu anderen indirekten Applikationsformen, wird bei der enteralen Applikation der für teratogene Wirkungen verantwortliche Blutspiegel relativ spät erreicht. Intraindividuelle Schwankungen bei der Resorption können sich dabei erheblich auswirken.

B. Parenterale Applikation

Nach subkutaner, intramuskulärer und besonders nach intraperitonealer Injektion von Substanzen erfolgt die Resorption im Vergleich zur enteralen Applikation rasch. Ein entsprechender Blutspiegel wird somit schnell und sicher erreicht. Im Gegensatz zur intravasalen Applikation müssen die zu untersuchenden Substanzen jedoch ebenfalls erst resorbiert werden, bevor sie in den Blutkreislauf gelangen.

Nach intravasaler Injektion (meist i.v.) wird der für eine teratogene Wirkung entscheidende Blutspiegel vergleichsweise mit größter Sicherheit erreicht. Da eine so applizierte

Substanz direkt in das Blut gelangt, wird eine vorherige Resorption mit ihren Auswirkungen umgangen.

Die Möglichkeit einer Metabolisierung der untersuchten Substanzen ist nach parenteraler und enteraler Applikation gleichermaßen gegeben. Bei allen indirekten Applikationsformen ist es daher denkbar, daß die Grundsubstanz und ihre Metaboliten gleichzeitig ihre Wirkungen auf den Keim entfalten können. Ferner können Substanzen über Beeinflussung des mütterlichen Organismus, also sekundär, teratogen wirken.

Für die Untersuchungen auf Teratogenität sind die aufgeführten "konventionellen" Applikationsformen jedoch nicht in jedem Falle ausreichend.

3.2.2 Direkte Applikation am Säugetier und geschichtlicher Überblick

Der indirekten Applikation steht die direkte Applikation gegenüber. Die zu untersuchende Substanz wird hierbei so appliziert, daß sie in ihrer Wirkung auf den Embryo bzw. Feten weder vom mütterlichen Organismus noch von der Plazenta beeinflußt werden kann. Art und Dosis der Substanz die den Keim erreicht, stehen somit fest. Der Zeitpunkt der Einwirkung kann mit großer Genauigkeit bestimmt werden.

Bereits 1940 injizierte LAW 1:2:5:6-Dibenzanthrazen in die Amnionhöhle von Mäusen am 14. Tag p.c. in einer Dosis von 0,125 mg. Bei 82,6 % der Jungtiere traten bis zu ihrem 7. Lebensmonat primäre Lungentumore auf.

DIDCOCK et al. untersuchten 1956 den cytotoxischen Effekt von Trimethylcolchizinäther und von Podophyllotoxin. Sie injizierten beim Kaninchen 0,1 ml dieser Substanzen in die Amnionhöhle bzw. 0,05 ml in die Plazenta. Die Injektionen

wurden zwischen dem 15. und 21. Tag der Gestation durchgeführt, und 5 bis 8 Tage später wurden die Feten untersucht. Hierbei zeigte sich, daß Trimethylcolchizinäther direkt auf den Feten wirkte und Resorptionen verursachte. Nach Injektionen in die Plazenta hingegen wurde die Entwicklung des Feten weniger beeinflusst. DIDCOCK et al. beschrieben die Injektion in die Amnionhöhle als einfache und zuverlässige Methode zur Testung eines Medikaments auf cytotoxische Effekte.

Die Beobachtungen von TRASLER et al. (1956) zeigten jedoch einige negative Begleiterscheinungen der Amnionmethode auf. Sie behandelten 14 Mäuse am 13. Tag der Gestation, in dem sie in die jeweilige Amnionhöhle mit einer Nadel hineinstachen. 6 Mäuse resorbierten oder abortierten ihre Würfe. In den übrigen 8 Würfen traten gehäuft Gaumenspalten auf, die von den Autoren auf einen Verlust von Fruchtwasser zurückgeführt wurden. Ihre Warnung vor der Punktion der Amnionhöhle beim Menschen wirkte sich lange Zeit hemmend auf die Weiterentwicklung dieser Methode aus. 1960 wurde die Warnung von TRASLER et al. durch ähnliche Hinweise von KRESHOVER unterstützt.

1968 konnten TURBOW und CHAMBERLAIN nach Injektion von 6-Aminonicotinamid in die Amnionhöhle von Ratten ähnliche Fehlbildungen feststellen, wie nach konventioneller Behandlung des Muttertieres am gleichen Tag. Nur die Plazentagewichte waren nach Applikation von 6-Aminonicotinamid beim Muttertier signifikant verringert.

SCOTT (1970) untersuchte nach intrauteriner Applikation die Wirkung von Acetazolamid auf trächtige Wistar Ratten (11. Tag p.c.). Er injizierte 0,005 - 0,01 ml Acetazolamid (0,1 - 0,5 mg) in die Decidua capsularis oder in den Dottersack und in das Exocoel. Durch die letzte Applikationsform wurde teilweise auch die chorioallantoide Plazenta

oder die Decidua basalis der Acetazolamid Wirkung ausgesetzt. Obwohl die praktizierten Applikationsformen in der Lokalisation äußerst ungenau waren, konnte der Autor beobachten, daß bei zwei Jungtieren, die Acetazolamid in das Exocoel erhalten hatten, typische Acetazolamid-Mißbildungen (Ektrodaktylie) auftraten. Die kleine Menge von Substanz, die nötig war, um diese charakteristischen Deformitäten zu verursachen, zeigte, daß Acetazolamid, dessen einzige bisher bekannte Wirkung die Hemmung der Carboanhydrase war, direkt am Embryo teratogen wirkt.

Da TRASLER (1956) und KRESHOVER (1960) den Verlust von Fruchtwasser nach der Amnionhöhlenpunktion als Ursache für aufgetretene Gaumenspalten angesehen hatten, entwickelte DOSTAL (1970) eine Technik, mit deren Hilfe es gelang, das gehäufte Auftreten von Gaumenspalten nach Anwendung der Amnionmethode zu verhindern. Nach Injektion von 0,002 ml physiologischer Kochsalzlösung am 12. Tag p.c. in die Amnionhöhle von H-Velaz-Mäusen, traten nur in 4,8 % der Jungtiere Gaumenspalten auf. Hydrocortison verursachte dagegen am gleichen Tag in 78,8 % Gaumenspalten. Mit dieser Methode lassen sich nach DOSTAL genaue Untersuchungen der sensiblen Phasen des Keims durchführen und exakte Dosis-Wirkungsbeziehungen ermitteln.

CHAMBERLAIN und GOLDYNE, wandten die Amnionmethode 1970 bei Ratten an. Sie untersuchten die Wirkung von Nikotinsäure und einigen Coenzymen auf die Teratogenität des Antimetaboliten 6-Aminonicotinamid. Die Ergebnisse zeigten, daß durch Zusatz des Vitamins und der Coenzyme, die Mißbildungsfrequenz reduziert wurde. Die Mißbildungen nahmen in ihrem Schweregrad ab.

Der Einstich in die Amnionhöhle, die Injektion von Aqua dest. und von 6-Aminonicotinamid wurden in ihrer Wirkung an trächtigen Hamstern von TURBOW et al. (1971) unter-

sucht. 0,005 ml Aqua dest. verursachten am 7., 8. und 9. Tag p.c. 21 - 43 % Resorptionen. Nach dem Einstich an den gleichen Tagen traten nur 15 - 20 % Resorptionen auf. Für die relativ hohen Resorptionsraten nach Injektionen von Aqua dest. können mechanische (Volumenzunahme in der Amnionhöhle) und auch osmotische Faktoren eine Rolle gespielt haben. Nach 0,1 mg 6-Aminonicotinamid-Injektion stieg die Resorptionsrate auf 81 %.

Hamstern, die sich am 8. Tag p.c. befanden, injizierten STORCH und LAYTON (1973) Acetazolamid zwischen die Implantationsstellen in den Uterus. Hohe Konzentrationen der Testsubstanz konnten auf diese Weise ohne mechanische Gefährdung in den Keimanlagen erzielt werden. Die Häufigkeit der Vorderpfotenmißbildungen war auf der Acetazolamid Seite im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht.

Im Gegensatz zu den Injektionen in die Amnionhöhle, kann bei der Substanzapplikation in das Uteruslumen jedoch keine genaue Aussage über die direkt an der Keimanlage wirkende Substanzmenge gemacht werden.

CLAUSSEN und BROEDERSDORFF untersuchten 1974 die teratogene Wirkung von 6-Aminonicotinamid nach direkter Applikation in den Dottersack von Kaninchen, die sich am 9. Tag p.c. befanden. Nach Injektion von 0,005 mg 6-Aminonicotinamid in 0,01 ml physiologischer Kochsalzlösung waren alle Jungtiere mißgebildet. 85 % der behandelten Keimanlagen wurden resorbiert.

Die wesentlichen Ursachen für das häufige Auftreten von Mißbildungen und Resorptionen auf der Kontrollseite in den Untersuchungen von CLAUSSEN und BROEDERSDORFF (1974) wurden von CLAUSSEN (1975) in einer operationsbedingten venösen Stauung im Uterusbereich und in postoperativen Entzündungen und Infektionen gesehen. Durch entsprechende Veränderungen der Versuchsanordnung konnte der Autor die Mißbildungs- und Resorptionsrate entscheidend senken.

A. Amnionmethode

Durch Injektion in die Amnionhöhle erreicht die zu untersuchende Substanz direkt den Keim. Wie auch bei den anderen direkten Applikationsmethoden am Säuger stellt die Narkose einen Störfaktor dar. Dieser kann in seiner Auswirkung erfaßt werden, da Versuch und auch Kontrolle an demselben Muttertier durchgeführt werden kann.

Ein wesentlicher Nachteil der Amnionmethode besteht jedoch darin, daß in die Amnionhöhle erst zu einem späten Zeitpunkt der Embryonalentwicklung injiziert werden kann. Einige Organe haben dann bereits ihre sensiblen Phasen durchlaufen, und der Keim reagiert somit nicht mehr maximal empfindlich.

B. Dottersackmethode

Für die Dottersackmethode gilt prinzipiell das gleiche wie für die Amnionmethode. Die zu untersuchende Substanz kann jedoch zu einem Zeitpunkt appliziert werden, an dem der Embryo auf teratogene Noxen äußerst empfindlich reagiert. Darüber hinaus ist die Durchführung dieser Methode einfach.

Bei allen direkten Applikationsmethoden bezieht sich die Aussage primär auf den behandelten Keim. Eine Extrapolation der Ergebnisse vom Embryo des Versuchstieres auf den menschlichen Embryo ist hierbei gut möglich, da die Unterschiede in der Ontogenese innerhalb einer Klasse als gering anzusehen sind. Darüber hinaus sind vergleichende teratologische Untersuchungen nach direkter und indirekter Substanzapplikation möglich. Unterschiede zwischen den Ergebnissen lassen Rückschlüsse auf eventuelle Aktivierung und Inaktivierung der betreffenden Substanz im mütterlichen Organismus, in der Plazenta und im Feten zu.

3.3 Diskussion der für teratologische Testmethoden bedeutsamen Parameter

Entscheidend für die teratogene Wirkung einer Substanz ist neben dem Zeitpunkt der Einwirkung die Menge, welche den Keim erreicht. Auf dem Weg zum Embryo bzw. Feten kann diese Substanz durch folgende Faktoren entscheidend beeinflußt werden:

1. Aufnahme der Substanz (Diffusion, Resorption)
2. Transport im mütterlichen Blut
3. Möglicher Metabolismus im mütterlichen Organismus und Elimination
4. Durchtritt und Metabolismus in der Plazenta

Es ist denkbar, daß diese Faktoren beim Menschen eher erheblichen Schwankungen unterliegen, als im standardisierten Tierversuch.

Der Punkt 4 muß in der Pharmakokinetik besondere Bedeutung erlangen. Außer der mütterlichen Leber ist auch die Plazenta in der Lage Pharmaka chemisch zu verändern, wenn auch hier gegenüber der Leber die Kapazität wohl als gering anzusehen ist (NETTER, 1971).

Im allgemeinen wird die Plazenta als aus Lipoproteinen bestehend angesehen (MIRKIN, 1973). Demgemäß sind lipophile Substanzen eher als ionale in der Lage diaplazentar zu wirken; der pKa-Wert ist daher ein entscheidender Faktor bei der Penetration von ionalen Substanzen.

Das Molekulargewicht ist limitierend für die Passage der Plazenta. Liegt es unterhalb 600, so können die betreffenden Stoffe relativ leicht permeieren; bei einem Molekulargewicht über 1000 sind Agentien relativ impermeabel. Da die meisten Medikamente Molekulargewichte zwischen 250 und 400 haben, muß man bei einer medikamentösen Therapie

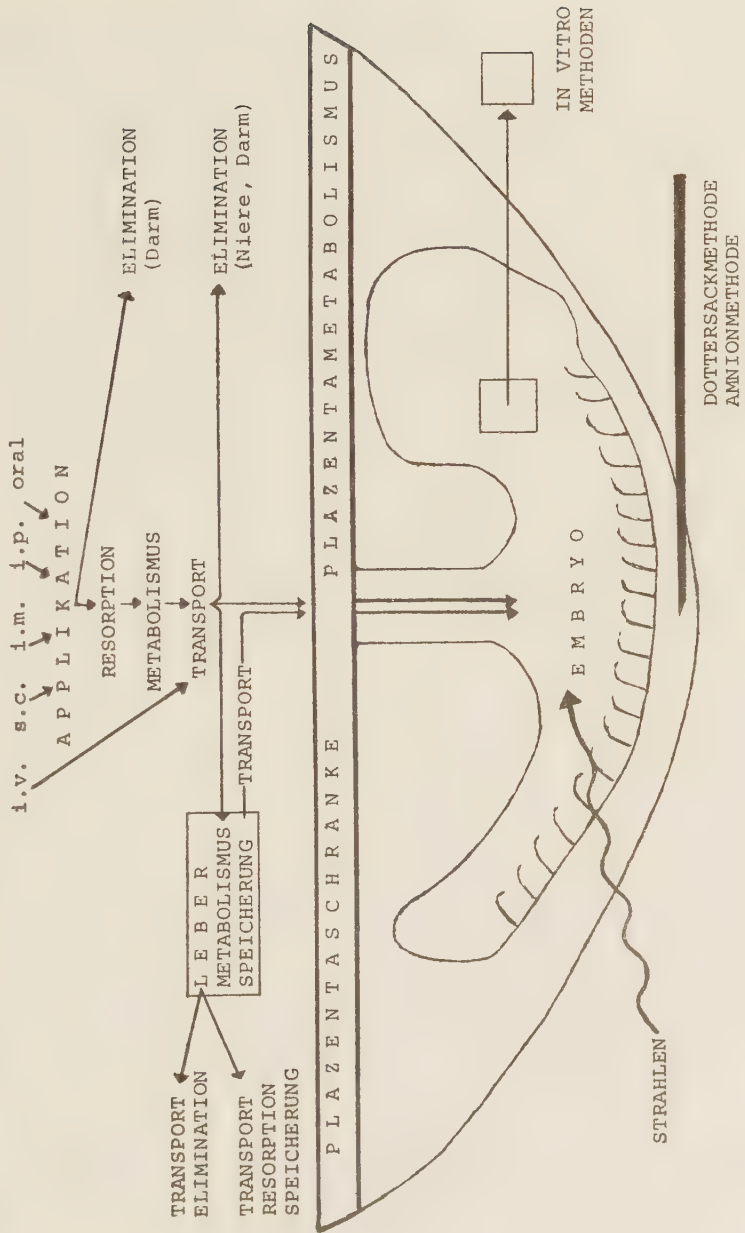
während der Schwangerschaft damit rechnen, daß sie die Plazentaschranke überwinden können (MIRKIN, 1973).

An Protein gebundene Substanzen passieren die Plazenta in der Regel langsamer oder überhaupt nicht. Das Verhältnis von freier zu gebundener Substanz kann dabei für die teratogene Wirkung entscheidend sein. Die Eiweißbindung beträgt z.B. für das Tetracyclin Doxycyclin 82 % im menschlichen Serum (WINKLER und WEIH, 1967).

Da die Plazenta ihre Struktur und Funktion hormonell abhängig verändert, ist auch ihr Alter ein wichtiger Faktor für die Wirkungen am Embryo bzw. Feten (STRAUSS et al., 1965).

Zusammenfassend sind die für die Teratologie wichtigsten Wege einer Substanz nach der Applikation in Abb. 2 dargestellt.

Abbildung 2: Mögliche Pharmakokinetik einer Substanz bis zum Erreichen des Embryos.



EIGENE UNTERSUCHUNGEN

=====

4. DIE DOTTERSACKMETHODE UND IHRE ANWENDUNG

1974 beschrieben CLAUSSEN und BROEDERSDORFF die Dotter-sackmethode zum ersten Mal am Säuger (Kaninchen).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit der gleichen Methode Vibravenös (Pfizer) auf Teratogenität getestet. Die untersuchte Substanz enthält im Steraject, einer Spritzampulle, das Tetracyclin Doxycyclin in dem Lösungsvermittler Polyvinylpyrrolidon 17 (PVP).

Doxycyclin, α -6-Desoxy-5-oxytetracyclin, hat ein Molekulargewicht von 513 und besitzt die Summenformel $C_{22}H_{24}O_8N_2 \cdot HCL$. Die chemische Struktur und das antibakterielle Spektrum von Doxycyclin sind "Tetracyclin spezifisch" (Abb. 3).

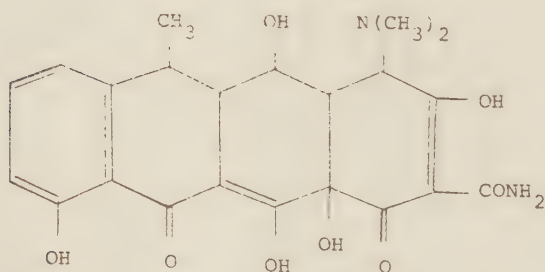


Abbildung 3: Strukturformel von Doxycyclin

4.1 Darstellung der Dottersackmethode

Als Versuchstiere wurden Kaninchen (Weiße Neuseeländer), aus einem für Versuchszwecke aufgebauten Stamm (Kaninchenfarm Kostrop, Meerbusch-Boesinghoven) verwandt.

Die Paarung (Tag 0) der Kaninchen wurde auf natürliche Weise durchgeführt, wobei doppelt belegt wurde. Am neunten Tag der Gestation wurden sie vom Zuchtstall in den Institutsstall überführt, wo sie mit standardisiertem Trockenfutter der Fa. Höveler und Wasser ad libitum ernährt wurden. Durch eine Belüftungsanlage und Beachtung des Tag-Nacht-Rhythmus konnten die Bedingungen im Institutsstall annähernd konstant gehalten werden.

Durch Betastung der Kaninchen in der Uterusgegend konnte am neunten Tag eine bestehende Schwangerschaft mit großer Sicherheit erfaßt werden. Die Keimanlagen ließen sich hierbei als klein-kirschgroße Gebilde von prall-elastischer Konsistenz im Unterbauch fühlen, und auch ihre Anzahl konnte grob abgeschätzt werden.

Nach Feststellung einer bestehenden Gravidität wurden die Kaninchen zur Laparotomie, während der die Applikation in den Dottersack der Embryonen erfolgen sollte, vorbereitet.

Während der Narkoseeinleitung wurden sie in eine Box gesperrt, die ihrer Körperlänge anpassbar war (Abb. 4). Hierdurch wurden ihre Bewegungsmöglichkeiten stark eingeschränkt. Diese Beschränkung war nötig, da die Kaninchen bei der ersten Inhalation der Narkosegase große Abwehrkräfte entwickeln. Dadurch können plötzliche Überstreckungen zu Wirbelfrakturen mit daraus resultierenden Paresen führen.

Zur Narkose (Maske) wurde ein aus Äther pro narcosi und Sauerstoff bestehendes Gasgemisch verwandt. In der einlei-

tenden Phase wurde, um einen schnellen Wirkungseintritt der Narkose zu erzielen, ein Gemisch von ca. 25 Vol% Äther zu 75 Vol% Sauerstoff im Äther-Verdunster "Vapor" der Fa. Dräger eingestellt. Der Ätheranteil wurde nach Erzielung einer ausreichenden Narkosetiefe (nach ca. 5 min) und Muskelrelaxanz auf 15 % reduziert. Ein zusätzliches Narkotikum mußte nicht verwandt werden, da die narkotische, analgesierende und relaxierende curareartige Wirkung (KUSCHINSKY und LÜLLMANN, 1974) des Äther für eine durchschnittliche Operationsdauer von 15 min ausreichten. Zudem verlangt jeder teratologische Test, daß möglichst wenig Störgrößen verwandt werden.

Nach Lagerung des Kaninchens auf dem Operationstisch (Rückenlage), wurde das Fell in einer Breite von ca. 4 cm und einer Länge von ca. 10 cm im Medianbereich oberhalb der Symphyse abrasiert. Die Markierung und Desinfektion des Operationsfeldes geschah mit gefärbtem Dibromol (Abb. 5).

Nach Abdeckung dieses Bereiches mit einem sterilen Schlitztuch, wurde ein Hautschnitt gelegt (Medianlinie) und dann der Bauchraum durch einen ca. 7 cm langen Schnitt (Linea alba) eröffnet (Abb. 6). Danach waren der Uterus duplex mit den Keimanlagen, die Blase, je nach Füllungszustand, und die Darmschlingen im gespreitzten Wundbereich sichtbar (Abb. 7).

Am Uterus duplex ließ sich die Bifurkationsstelle deutlich erkennen, so daß eine Unterscheidung von rechtem und linkem Horn keine Schwierigkeiten bereitete.

Die Behandlung wurde durch Injektion von jeweils 0,01 ml der Testsubstanz in den Dottersack der einzelnen Keimanlage durchgeführt (Abb. 8 und 9). Mit einer Terumo-

Mikroliterspritze wurden diese 0,01 ml in jeden Dottersack tangential injiziert. Durch das tangentiale Einführen der Nadel wurde ein Ausfließen des Dottersackmaterials vermieden, da der physiologische Innendruck den schrägverlaufenden Injektionskanal sofort schloß. Das Volumen des Dottersacks beträgt am 9. Tag ungefähr 1 ml.

Der Einstich konnte so gezielt durchgeführt werden, daß die deutlich sichtbaren Dottersackgefäße (*Arteria et Vena vitellina*) und der Embryo nicht verletzt wurden (Abb. 10).

Nach Applikation der zu untersuchenden Substanzen wurden die Bauchdecken (Peritoneum und Muskulatur) durch eine fortlaufende Naht aus Seide geschlossen (Abb. 11). Seide erwies sich als notwendig, da Catgut nach wenigen Tagen resorbiert wird, und somit heftige Spontanbewegungen der Kaninchen in der postoperativen Phase zu Bauchdeckenbrüchen führen können.

Vor der Hautnaht (Abb. 12) wurde die Ätherzufuhr abgestellt. Die Tiere atmeten noch ca. 10 min reinen Sauerstoff. Nebacetin Puder (Neomycin und Bacitracin) auf der geschlossenen Wunde diente als Prophylaxe gegen Infektionen.

Ungefähr 10 min nach der Operation nahmen die Kaninchen wieder ihre natürliche Hockstellung ein.

Neunzehn Tage nach der Operation, d.h. am 28. Tag p.c., wurden die Muttertiere getötet und die Uteri entnommen. Hierbei wurde in einer Sektion jedes Muttertier auf pathologische Veränderungen, besonders im Magen-Darm-Bereich, in der Niere, der Leber und der Lunge, makroskopisch untersucht.

Nach der Hysterektomie wurden die Feten aus ihren Eihäuten entfernt und anhand von Spontanbewegungen als lebend registriert. Danach wurden sie in einer geschlossenen Glasschale durch Inhalation von Äther getötet.

An den Uteri waren neben den lebenden Jungtieren noch die verschiedenen Stadien der Resorptionen zu erkennen.

Frühe Stadien lassen sich kaum vom physiologischen Uterusrelief unterscheiden. Sie zeigen einen gelblichen Farbton und haben eine zerklüftete Oberfläche in ihren knapp 1 qcm großen Arealen (Resorption 1. Grades).

Ontogenetisch ältere Resorptionen sind durch ihre papulöse Form und feste Konsistenz gekennzeichnet. Gallertartige Zentren finden sich häufig in diesen Resorptionsarealen (Resorption 2. Grades).

Eine weitere Gruppe von Resorptionen läßt deutlich einen verschieden weit entwickelten Keim erkennen (Resorption 3. Grades). Ihre Entstehung liegt ontogenetisch am spätesten.

Die Feten wurden nach der Entnahme aus den Eihäuten gewogen und auf makroskopisch erkennbare Mißbildungen untersucht. Danach wurde die Haut abgezogen. Während der folgenden Präparation wären eventuelle Ektopien, Dysplasien und Aplasien der Organe erkannt worden.

Anschließend wurden die Skelette getrocknet und hiernach in 1 % Kalilauge 24 h lang mazeriert. Nach der Mazeration konnten die Skelette im basischen Medium mit Alizarin gefärbt werden. In einer aufsteigenden Äthylalkoholreihe von 50 - 100 % wurden sie entwässert und bis zur stereomikroskopischen Begutachtung in Benzylalkohol aufbewahrt, wobei gleichzeitig die verbliebenen Weichteile aufgehellt wurden.

Die nun blau gefärbten Skelette wurden bei 3 - 16facher Vergrößerung untersucht und Mißbildungen registriert.

Hiernach wurde die Scheitel-Steiß-Länge (SSL) der Feten gemessen.

Nicht aufgenommen in die statistische Auswertung wurden die Ergebnisse jener Muttertiere, die Infektionen, Verwachsungen, Verklebungen, Paresen und ähnliche pathologischen Veränderungen aufwiesen.

Für die Auswertung wurde der einseitige Wilcoxon Paardifferenzentest gewählt und das Signifikanzniveau auf $p = 0,05$ festgelegt.

Für eine Korrelationsbetrachtung zwischen den Merkmalen SSL und Fetengewicht auf der einen Seite und der Implantationszahl und Wurfgröße auf der anderen Seite wurde das Signifikanzniveau auf $p = 0,01$ festgelegt.

4.2 Testung von Doxycyclin, Polyvinylpyrrolidon und physiologischer Kochsalzlösung mit der Dottersackmethode

Versuchsserie I:

In die Keimanlagen (Dottersack) beider Seiten des Uterus duplex wurde 0,01 ml physiologische Kochsalzlösung injiziert.

Versuchsserie II:

In die Keimanlagen (Dottersack) einer Seite des Uterus duplex wurde PVP 17, in einem Gemisch aus physiologischer Kochsalzlösung und Aqua bidest. (4 : 1) aufgelöst, injiziert. Die applizierte Gesamtmenge betrug, wie auch in den anderen Versuchsserien, 0,01 ml. Darin waren 0,5 mg PVP enthalten. Die Mengenverhältnisse von PVP, physiolo-

gischer Kochsalzlösung und Aqua bidest. waren mit denen der Versuchsserie III identisch.

Zum Vergleich wurden auf der anderen Seite des Uterus 0,01 ml physiologische Kochsalzlösung und Aqua bidest. im Verhältnis 4 : 1 injiziert (Kontrolle bei genau demselben Muttertier).

Versuchsserie III:

In die Keimanlagen (Dottersack) eines Uterushorns wurde Vibravenös mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt injiziert.

Für den Ansatz der injizierten Lösung wurde ein Vibravenös Steraject verwandt. In den 5 ml Flüssigkeit des Steraject sind 100 mg Doxycyclin enthalten. Die applizierte Dosis von 0,05 mg/Dotterack (ca. 1 g) wurde durch Verdünnung der Sterajectlösung mit physiologischer Kochsalzlösung erhalten. Da die therapeutische Dosis von Doxycyclin beim Menschen 4 mg/kg Körpergewicht (SCHRÖR, 1974) beträgt, entsprechen 0,05 mg Doxycyclin/Dotterack mit Einschränkungen der 10fachen therapeutischen Dosis.

In 0,01 ml applizierter Flüssigkeitsmenge waren zusätzlich zu Versuchsserie II 0,05 mg Doxycyclin und ungefähr 0,006 mg Magnesium enthalten. Entsprechend der Serie II waren noch 0,5 mg PVP in der Lösung. Das Mengenverhältnis von physiologischer Kochsalzlösung zu dem im Vibravenös enthaltenen Aqua bidest. betrug ebenfalls 4 : 1.

Auf der anderen Seite des Uterus wurde zum Vergleich 0,01 ml physiologische Kochsalzlösung injiziert (Kontrolle bei genau demselben Muttertier).

4.3 Grundzüge der Embryogenese des Kaninchens unter besonderer Berücksichtigung des neunten Tages

Bei der Begattung des Kaninchens führt der Orgasmus über das Sexualzentrum im Zwischenhirn zu einer plötzlichen Ausschüttung von Follikelreifungshormon mit einem gewissen Anteil an Luteinisierungshormon (SEIDEL, 1960). Dadurch erfolgt ca. 10 h später eine provozierte Ovulation und ca. 2 h danach die Konzeption. Wegen dieser relativ genauen Zeitbestimmung, lassen sich ohne Schwierigkeiten zu bestimmten sensiblen Entwicklungsphasen teratologische Untersuchungen durchführen.

Nach GOTTSCHESKI und ZIMMERMANN (1973) kann man die Entwicklungsstufen des Hauskaninchens durch folgende Perioden beschreiben.

Die ersten drei Tage sind entscheidend für die Morphogenese, die durch die Bildung einer Morula gekennzeichnet ist. Vom 4. bis 6. Tag p.c. entwickelt sich ein fester Kontakt zur Uteruswand im Rahmen der Blastogenese. Die folgende Phase der Embryogenese wird vom 7. bis 10. Tag p.c. durch die Organogenese ausgefüllt, die schließlich in die Fetogenese überleitet. Am 31. Tag (± 1) p.c. wird die intrauterine Entwicklung des Feten durch die Geburt beendet.

Zum Verständnis des Entwicklungsstandes am 9. Tag der Gravidität und zur besseren chronologischen Einordnung, müssen noch Betrachtungen einzelner Entwicklungsphasen durchgeführt werden.

Ab 6. Tag p.c. ist die Aufnahme von Uterussekreten möglich. 7 1/2 Tage p.c. erfolgt die Ernährung über Trophoblastsprossen, d.h. es wird Histiotrophe aufgenommen. Vom 8. Tag an läßt sich der Säugetiertypus erkennen, und die Plazentation wird deutlich.

Am 9. Tag wird die Plazenta von der Allantois erreicht. Der Embryo besitzt zu diesem Zeitpunkt ungefähr 18 Ursegmente, ein dreigliedriges Gehirn mit Ausstülpung der Augenanlagen und ein bis auf den vorderen Neuoporus geschlossenes Neuralrohr. Eine Aufwölbung der Amnionfalte umgibt zu diesem Zeitpunkt den Keim. Der Dottersack, welcher am 9. Tag p.c. voll ausgebildet ist, wird bis zum 11. Tag durch das Exocoel verdrängt. Gleichzeitig haben sich die fetalen Blutgefäße in der Plazenta entwickelt, und der Arttypus ist morphologisch festgelegt.

Eine natürliche Geburt am Ende der Gravidität zu ermöglichen, ist in teratologischen Experimenten am Tier nicht sinnvoll, da durch sie zahlreiche Störungen auftreten können, welche die Auswertung von Ergebnissen erschweren oder sogar verfälschen können. Ein verzögerter Geburtstermin, ein zu langsamer Geburtsvorgang, ein verfrühtes Reißen von Chorion und Amnion (eventuell bei Steißlagen) und mangelhafter Brutinstinkt des Muttertieres sind solche negativen Faktoren (GOTTSCHEWSKI und ZIMMERMANN, 1973).

Der 9. Tag der Gestation empfahl sich für die Wahl des Applikationstermins in den durchgeführten Untersuchungen, da zu diesem Zeitpunkt der Dottersack der Kaninchenembryonen seine stärkste Ausprägung erreicht. Außerdem hatte sich dieser Tag in zahlreichen Untersuchungen als jener Zeitpunkt herausgestellt, an dem das Rumpfskelett seine maximale Empfindlichkeit auf teratogene Reize zeigt (DEGENHARDT, 1954, 1956, 1960; GROTE, 1965, 1969; GOTTSCHEWSKI und ZIMMERMANN, 1973).



Abbildung 4: Kaninchen vor der Narkose in der Festhaltebox



Abbildung 5: Kaninchen in Rückenlage auf dem Operations-
tisch. Das Operationsfeld ist mit gefärbter Dibromol des-
infiziert. Am oberen Bildrand ist der Äther-Verdunster zu
erkennen.



Abbildung 6: Medianschnitt beim narkotisierten Kaninchen.



Abbildung 7: Blick in den Bauchraum des Kaninchens nach Laparotomie. Am linken Bildrand sind der Dünndarm, in der Bildmitte zwei Keimanlagen und am rechten Bildrand die Blase zu erkennen.



Abbildung 8: Tangentialer Einstich und Injektion der zu untersuchenden Substanz mit einer Terumo Mikroliterspritze in den Dottersack einer Keimanlage des Kaninchens. - Natürliche Größe des Dottersacks: klein-kirschgroß



Abbildung 9: Tangentialer Einstich und Injektion der zu untersuchenden Substanz mit einer Terumo Mikroliterspritze in den Dottersack einer Keimanlage des Kaninchens. Ein Teil des Uterus duplex und die Dottersackgefäße sind sichtbar.

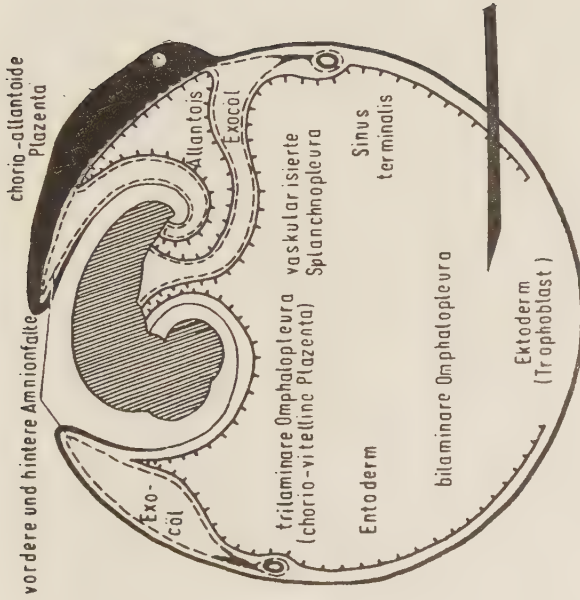


Abbildung 10: Schnitt durch die Keimanlage eines Kaninchenembryos (ca. 9. Tag der Gestation). Die Öffnung der Injektionsnadel liegt im Dottersack (nach GOTTSCHESKI und ZIMMERMANN 1973, verändert).



Abbildung 11: Fortlaufende Naht der Bauchmuskulatur und des Peritoneums. Im noch offenen Teil der Bauchhöhle sind Uterusschleifen zu erkennen.



Abbildung 12: Hautnaht mit Selde

5. VERSUCHSERGEBNISSE

Zur Testung von Vibravenös mit der Dottersackmethode wurden drei Versuchsserien (I, II, III) durchgeführt. Die erste Serie, in der nur physiologische Kochsalzlösung auf beiden Seiten des Uterus duplex in den Dottersack jeder Keimanlage injiziert wurde, diente als Basiskontrolle für die folgenden beiden Serien, in denen physiologische Kochsalzlösung als Lösungsmittel benutzt wurde.

20 trächtige Karinchen wurden am 9. Tag der Gestation mit 0,01 ml physiologischer Kochsalzlösung gemäß den Ausführungen bei Darstellung der Dottersackmethode behandelt (Serie I). Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 und 5 zusammengestellt.

Die insgesamt 196 Implantationen sind auf die 20 Muttertiere mit einer durchschnittlichen Implantationszahl von 9,8 pro Tier verteilt. Aus diesen 196 Implantationen, die am 9. Tag p.c. bestimmt wurden, entwickelten sich 157 lebende Feten mit einer Durchschnittszahl von 7,85 pro Uterus. 38 Implantationen bildeten sich auf verschiedenen Entwicklungsstufen zurück und wurden resorbiert. Ein toter Fetus wurde registriert.

In Bezug auf die gefundenen Mißbildungen ergeben sich zwei Möglichkeiten der Beschreibung: 1. als Mißbildungsrate (Verhältnis zwischen der Anzahl der mißgebildeten Feten und der Implantationszahl) oder 2. als Mißbildungsfrequenz (Verhältnis zwischen der Anzahl der mißgebildeten Feten und der Anzahl der lebenden Feten).

Für die Mißbildungsfrequenz läßt sich der Wert 24,2 % errechnen und für die Mißbildungsrate 19,4 %. Eine differenzierte Betrachtung der einzelnen Mißbildungsmuster zeigt, daß Einzelmißbildungen gehäuft auftraten. Wirbel- und Rippenmißbildungen fanden sich bei 12 Feten isoliert und nur

bei 7 Feten gleichzeitig (Tab. 5). Diese kombinierte Mißbildungsform entspricht dem von THEILER (1968) beschriebenen Wirbel-Rippen-Syndrom, welches auf fehlerhafter Somitenbildung beruht (Abb. 13). Die phänokritische Phase dieser Mißbildung entspricht beim Kaninchen ungefähr dem 9. Tag p.c.

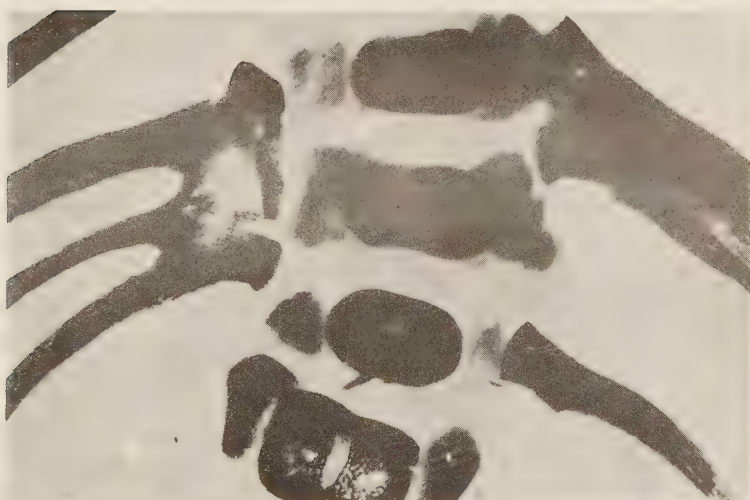


Abbildung 13: Synostose der 11. und 12. Rippe links und der 11., 12. und 13. Rippe rechts. Die Brustwirbel sind hypoplastisch verformt. Mit Doxycyclin behandeltes Jungtier aus Serie III (Doxycyclin/NaCl).

Die Wirbelmißbildungen sind Spaltwirbel, Keilwirbel, Blockwirbel und Hypoplasien. Bei den Sternalsegmenten wurden die Aplasie und Dysplasie des 5. Segmentes als Variation gewertet, im Gegensatz zu Synostosen und Fehldifferenzierungen der übrigen Segmente (Abb. 14). Syndaktylien an den Extremitäten gehören zu den häufigsten Mißbildungen in diesem Bereich. Jeweils eine Omphalocoele und eine Fibulaaplasie traten in Serie I auf. Die drei beobachteten Mikrophthalmien waren einseitig.

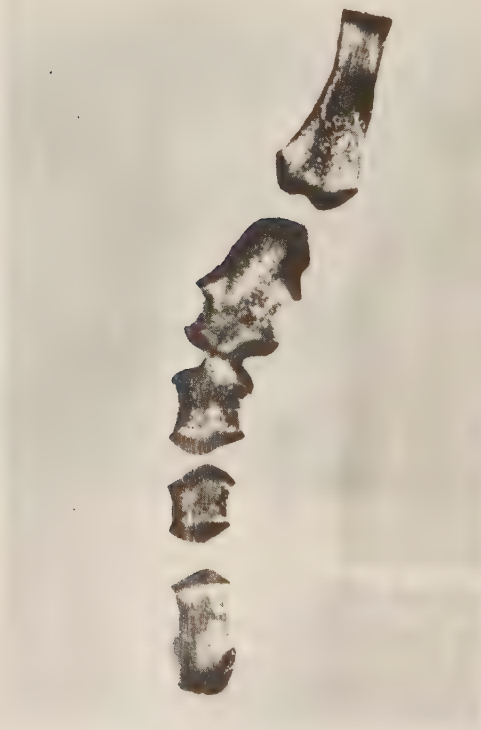


Abbildung 14: Synostose des 2. und 3. Sternalsegmentes. Jungtier aus Serie I (NaCl/NaCl).

Für die SSL ergab sich ein Durchschnittswert von 7,2 cm bei den lebenden Feten. Das Durchschnittsgewicht der Feten betrug 37 g.

Um an dieser Basisuntersuchung einen Zusammenhang zwischen Implantationszahl, Wurfgröße, SSL und Gewicht zu ermitteln, wurden Korrelationen und Regressionen bestimmt.

Die entsprechenden Wertepaare wurden als Punkte in Koordinatensystemen eingetragen, wobei die zu jedem Mittelwert (SSL und Gewicht) gehörende Implantationszahl bzw. Wurfgröße auf der Abzisse abgetragen wurde.

Die Betrachtung des mittleren Gewichts in Bezug auf die jeweilige Implantationszahl ergab einen empirischen Korrelationskoeffizienten von $-0,16$ und einen Regressionskoeffizienten von $-0,3$. Es läßt sich ein leicht negativer Zusammenhang zwischen den untersuchten Größen vermuten. Allerdings ist zu beachten, daß die Punkte sehr stark um die Regressionsgerade $y = -0,3X + 42,54$ streuen, und somit der Korrelationskoeffizient betragsmäßig sehr niedrig ist (Abb. 15).

Der Korrelationskoeffizient zwischen dem mittleren Gewicht und der Wurfgröße ist $-0,64$. Dieser Wert ist signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 %.

Mit zunehmender Wurfgröße nimmt das mittlere Gewicht der Feten ab. Der Regressionskoeffizient ist in diesem Fall $-2,21$ und die dazugehörige Gerade wird durch $y = -2,21X + 57,03$ beschrieben (Abb. 16). Der Abstand zwischen den Punkten (mittleres Gewicht/Wurfgröße) und der Regressionsgerade ist deutlich geringer als in der ersten Betrachtung.

Der empirische Korrelationskoeffizient zwischen der SSL und der Implantationszahl beträgt $-0,26$; der empirische Regressionskoeffizient ist hierbei $-0,03$. Die Regressionsgerade läßt sich nach der Gleichung $y = - 0,03X + 7,75$ zeichnen (Abb. 17). Es besteht keine Signifikanz ($P = 0,01$) zwischen den betrachteten Merkmalen.

Noch deutlicher demonstrieren der empirische Korrelationskoeffizient $- 0,29$ und der Regressionskoeffizient $- 0,06$, daß man eine negative Korrelation zwischen der SSL und der Wurfgröße vermuten könnte, obwohl sich mathematisch keine Signifikanz ($P = 0,01$) ergibt. Die zu dieser Betrachtung gehörende Regressionsgerade hat die Form $y = - 0,06X + 7,93$ (Abb. 18).



$n = 20$
 $\bar{y} = - 0,3x + 42,54$
 $r = - 0,16$

Abbildung 15: Regressionsgerade für das Merkmal "Gewicht der Feten" in Abhängigkeit vom Merkmal "Implantationszahl" bei den Werten der Serie I (NaCl/NaCl).

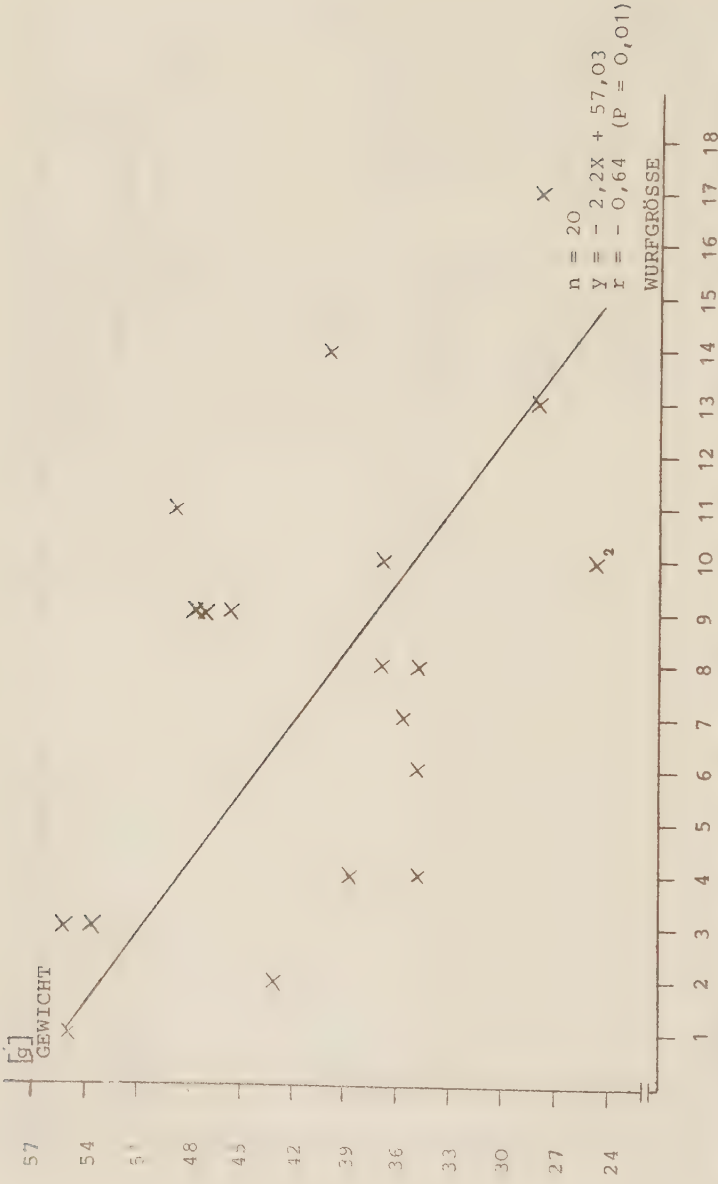


Abbildung 16.: Regressionsgerade für das Merkmal "Gewicht der Feten" in Abhängigkeit vom Merkmal "Wurfgröße" bei den Werten der Serie I (NaCl/NaCl).



Abbildung 17: Regressionsgerade für das Merkmal "Scheitel-Steiß-Länge (SSL) der Feten" in Abhängigkeit vom Merkmal "Implantationszahl" bei den Werten der Serie I (NaCl/NaCl).



Abbildung 18: Regressionsgerade für das Merkmal "Scheitel-Steiß-Länge (SSL) der Feten" in Abhängigkeit vom Merkmal "Wurfgröße" bei den Werten der Serie I (NaCl/NaCl).

Da Vibravenös neben dem Antibiotikum Doxycyclin zusätzlich PVP enthält, mußte dieser Lösungsvermittler ebenfalls mit der Dottersackmethode auf Teratogenität untersucht werden (Serie II).

Die noch zur Stabilisation der Lösung vorhandenen Magnesium-Ionen wurden wegen ihrer geringen Menge nicht näher auf Teratogenität überprüft. In 0,01 ml Injektionslösung (Serie III) waren insgesamt ca. 0,006 mg Magnesium enthalten; hiervon waren jedoch ca. 0,003 mg komplex an Doxycyclin gebunden.

Die injizierte Lösung enthielt auf der Versuchsseite 0,5 mg PVP, gelöst in 0,01 ml physiologischer Kochsalzlösung und Aqua bidest. (0,0075 ml und 0,0025 ml).

Zur Kontrolle wurden auf der anderen Seite des Uterus 0,01 ml physiologische Kochsalzlösung und Aqua bidest., ebenfalls im Verhältnis 4 : 1, injiziert.

Durch diese Versuchsanordnung wurde speziell PVP auf Teratogenität nach direkter Applikation getestet.

Die Ergebnisse von Serie II sind in Tabelle 3 und 5 zusammengefaßt.

178 Implantationen von 17 Muttertieren wurden untersucht.

Die PVP-Lösung wurde in 86 Keimanlagen und die Vergleichslösung in 92 Keimanlagen injiziert.

Bezogen auf die Implantationszahl betrug die Anzahl der lebenden Feten auf der PVP-Seite 76,7 % und auf der Kontrollseite 78,3 %. Zwischen den Resorptionsraten besteht kein signifikanter Unterschied (23,3 % auf der PVP-Seite und 21,7 % auf der Kontrollseite; Abb.19).

Zwischen der Mißbildungsrate und der Mißbildungsfrequenz in Serie II bestehen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Einer Mißbildungsrate von 14 % bei den PVP-Tieren stehen 14,1 % auf der Kontrollseite gegenüber. Die entsprechende Mißbildungsfrequenz beträgt 18,2 % bzw. 18,1 % (Abb. 20).

Das Mißbildungsspektrum in Serie II zeigt im Vergleich zu Serie I keine auffallenden Unterschiede (Tab. 5). Lediglich bei fünf Feten traten Mißbildungskombinationen auf, die in Serie I nicht zu finden waren; z.B. Wirbel-, Rippen-, Schädelmißbildungen und Wirbel-, Sternal-, Schädelmißbildungen mit einseitiger Nierenaplasie und Fehldifferenzierungen im Lippen-Kiefer-Gaumen Bereich (LKG). Eine deutliche Seitendifferenz zwischen Versuch und Kontrolle in Serie II, ist am Mißbildungsspektrum jedoch nicht zu erkennen (Tab. 5).

Auch die SSL und Fetengewichte lassen keine Rückschlüsse auf eine teratogene Wirkung von PVP zu. Eine SSL von 6,3 cm und ein Fetengewicht von 26,4 g ergeben sich nach PVP Injektion. Nach Lösungsmittelinjektion sind die entsprechenden Werte nur geringfügig größer: 6,7 cm und 27,1 g.

Nach Auswertung der Ergebnisse lassen sich in keinem Bereich signifikante Seitenunterschiede finden. PVP wirkte in einer Dosis von 0,5 mg nach Injektion in den Dottersack nicht teratogen.

In Serie III wurde, nachdem die anderen Bestandteile des Vibravenös mit der Dottersackmethode getestet waren, das Doxycyclin auf Teratogenität untersucht.

Die Ergebnisse von Serie III sind in Tabelle 4 und 5 zusammengefaßt.

152 Keimanlagen von 13 Muttertieren wurden behandelt.

75 erhielten Vibravenös und 77 Embryonen dienten als Kontrolle.

Von den mit der Testlösung behandelten Embryonen überlebten 35 (46,7 %); auf der Kontrollseite entwickelten sich 54 Jungtiere (70,1 %). Dieser Unterschied erweist sich als signifikant.

Dementsprechend sind auch die Resorptionsraten signifikant unterschiedlich. 40 Resorptionen auf der Doxycyclinseite entsprechen einer Resorptionsrate von 53,3 %. Auf der Lösungsmittelseite fanden sich 23 Resorptionen (29,9 %; Abb. 21).

Vibravenös verursachte eine Mißbildungsrate von 32 % und eine Mißbildungsfrequenz von 68,6 %. Auf der Lösungsmittelseite betrug dagegen die Mißbildungsrate 11,7 % und die Mißbildungsfrequenz 16,7 % (Abb. 22). Diese Unterschiede sind ebenfalls signifikant.

Ein Vergleich von Versuch und Kontrolle in Serie III weist darüber hinaus auch Unterschiede im Mißbildungsspektrum und in der Kombination der Mißbildungen auf (Tab. 5).

Komplexe Mißbildungsmuster sind gehäuft auf der Vibravenös Seite zu beobachten. Auffallend ist das verstärkte Auftreten von Schädeldeformitäten bei den behandelten Tieren. Zwischenknochen in der Calvaria sind kennzeichnend für diese Mißbildungen. An kombinierten Mißbildungen finden sich auf der Kontrollseite nur 4 Wirbel-Rippen-Syndrome und in 2 Feten traten Wirbel-, Rippen-, Sternal- und Schädeldeformitäten gemeinsam auf. Dagegen ergibt sich auf der Doxycyclin-Seite ein wesentlich vielfälti-

geres Mißbildungsspektrum, in dem allein 16 kombinierte Mißbildungsformen beobachtet werden konnten.

Der Mittelwert der SSL der Doxycyclin Feten beträgt 6,6 cm (Kontrollwert 6,9 cm). Das Durchschnittsgewicht der Feten ist auf der Doxycyclin Seite 31,3 g, und auf der Lösungsmittelseite 31,9 g. Diese Unterschiede erweisen sich als nicht signifikant.

Verglichen mit den Kontrollserien der Untersuchungen von CLAUSSEN und BROEDERSDORFF (1974) sind die Mißbildungsfrequenzen und Resorptionsraten auf den Kontrollseiten der Serien I, II und III wesentlich niedriger. Die Mißbildungsfrequenz in den Kontrolltieren war in CLAUSSEN und BROEDERSDORFFs Untersuchungen 32 % und die Resorptionsrate 50 %.

Tabelle 2: Ergebnisse der teratologischen Untersuchungen nach Injektion von 0,01ml physiologischer Kochsalzlösung in jede Keimanlage (Dottersack) des Uterus duplex bei Kaninchen am 9. Tag p.c. (Serie I)

20 MUTTERTIERE			
0,01 ml NaCl		0,01 ml NaCl	
n	$\bar{n}$	$\overline{sn}$	%
Implantationen	9,80	0,73	100
Lebende Feten	7,85	0,69	80,1
Resorptionen	1,90	0,43	19,4
Tote Feten	0,05	0,00	0,5

Mißbildungsrate:	= 19,4%		
	Anzahl der mißgebildeten Feten		
	Anzahl der Implantationen		
Mißbildungsfrequenz:	= 24,2%		
	Anzahl der mißgebildeten Feten		
	Anzahl der lebenden Feten		

mittlere Scheitel-Steiß-Länge: 7,2 cm

mittleres Fetengewicht: 37 g

Tabelle 3: Ergebnisse der teratologischen Untersuchungen nach Injektion von 0,01ml Polyvinylpyrrolidon (PVP), Aqua bidest. und physiologischer Kochsalzlösung in die Keimanlagen (Dottersack) eines Horns des Uterus duplex bei Kaninchen am 9. Tag p.c. Aqua bidest. und physiologische Kochsalzlösung wurden in die Keimanlagen (Dottersack) des anderen Uterushorns injiziert. (Serie II)

17 MUTTERTIERE

	PVP, Aqua bidest., NaCl				Aqua bidest., NaCl			
	n	n	Sn	%	n	n	Sn	%
Implantationen	86	5,05	0,48	100	92	5,41	0,40	100
Lebende Feten	66	3,88	0,50	76,7	72	4,23	0,47	78,3
Resorptionen	20	1,17	0,31	23,3	20	1,17	0,26	21,7

Mißbildungsrate: (Def. s. Tabelle 2)			14,0%				14,1%	
Mißbildungsfrequenz: (Def. s. Tabelle 2)			18,2%				18,1%	
mittlere Scheitel-Steiß-Länge:			6,3cm				6,7cm	
mittleres Fetengewicht:			26,4g				27,1g	

Tabelle 4: Ergebnisse der teratologischen Untersuchungen nach Injektion von 0,01ml Doxycyclin (Doxy), PVP, Aqua bidest. und physiologischer Kochsalzlösung in die Keim- anlagen (Dottersack) eines Horns des Uterus duplex bei Kaninchen am 9. Tag p.c. Phy- siologische Kochsalzlösung wurde in die Keimanlagen (Dottersack) des anderen Uterus- horns injiziert. (Serie III)

13 MUTERTIERE

	Doxycyclin, PVP, Aqua bidest., NaCl				NaCl			
	n	$\bar{x}$	$\bar{Sx}$	%	n	$\bar{x}$	$\bar{Sx}$	%
Implantationen	75	5,76	0,72	100	77	5,92	0,68	100
Lebende Feten	35	2,69	0,47	46,7	54	4,15	0,55	70,1
Resorptionen	40	3,08	0,51	53,3	23	1,77	0,41	29,9

Mißbildungsrate: 32,0% 11,7%
(Def. s. Tabelle 2)

Mißbildungsfrequenz: 68,6% 16,7%
(Def. s. Tabelle 2)

Mittlere Scheitel-Steiß-Länge: 6,6 cm 6,9 cm

Mittleres Fetengewicht: 31,3 g 31,9 g

Tabelle 5: Häufigkeit der Mißbildungen in den einzelnen Versuchsserien

MISSBILDUNG	SERIE I	SERIE II+		SERIE III+	
	NaCl	PVP	NaCl	VIBRA	NaCl
W	11	3	3	3	2
St	8	2	1		
E	5				
M	3				
R	1				
Omphalozele	1				
Fibulaaplasie	1				
Sch		1	2	5	1
W,R	7	2	2	5	4
W,St	1	1	1	1	
W,Sch		2		2	
Sch,M				1	
W,R,St				2	
W,R,Sch			2		
W,Sch,L				1	
W,St,Sch			1		
W,R,St,Sch					2
W,St,Sch,L				1	
W,St,Sch,M		1			
W,R,St,Sch,L				3	
W,St,Sch,L,Niere			1		
ZAHL DER JUNGTIERE	38	12	13	24	9

+ siehe 4.2 "TESTUNG VON DOXYCYCLIN, POLYVINYLPYRROLIDON UND PHYSIOLOGISCHER KOCHSALZLÖSUNG MIT DER DOTTERSACKMETHODE"

VIBRA steht für VIBRAVENÖS

W = Fehlbildung im Bereich der Wirbelsäule

St = Fehlbildung im Bereich des Sternums

E = Fehlbildung im Bereich der Extremitäten

M = Mikrophthalmie

R = Fehlbildung im Bereich der Rippen

Sch= Fehlbildung im Bereich des Schädels

L = Spaltbildung im Lippen-Kiefer-Gaumen (LKG) Bereich

Abbildung 19: Prozentuale Verteilung der Resorptionen und der lebenden Feten nach Testung von Polyvinylpyrrolidon mit der Dottersackmethode bei Kaninchen (Serie II).

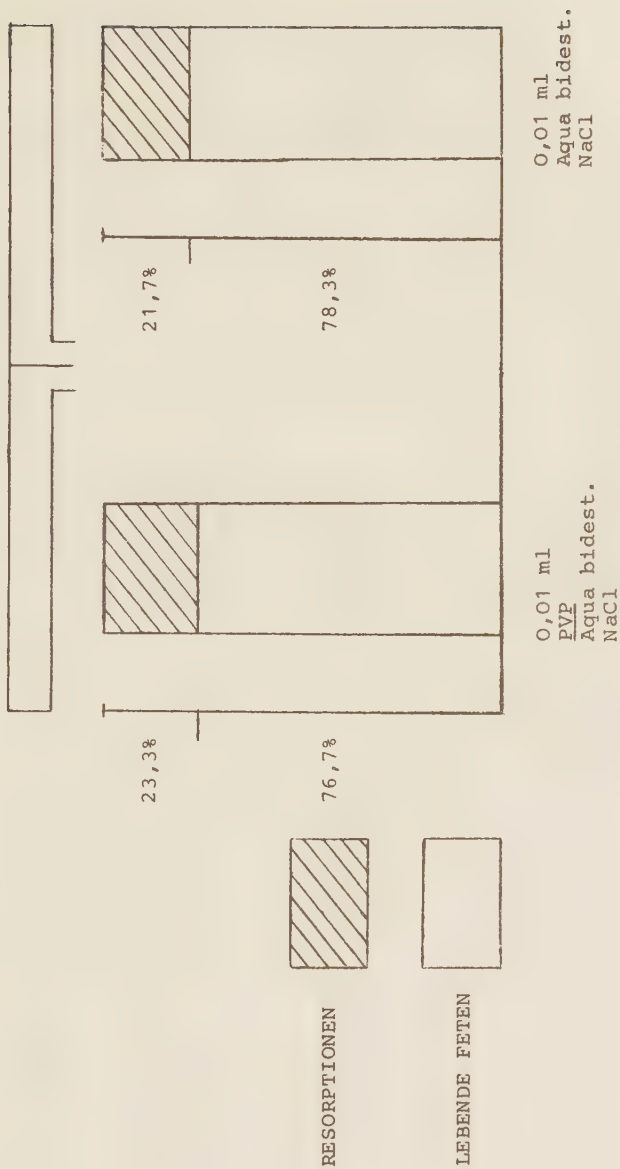


Abbildung 20: Prozentuale Verteilung der Feten ohne Mißbildungen und der Feten mit Mißbildungen nach Testung von Polyvinylpyrrolidon mit der Dottersackmethode bei Kaninchen (Serie II).

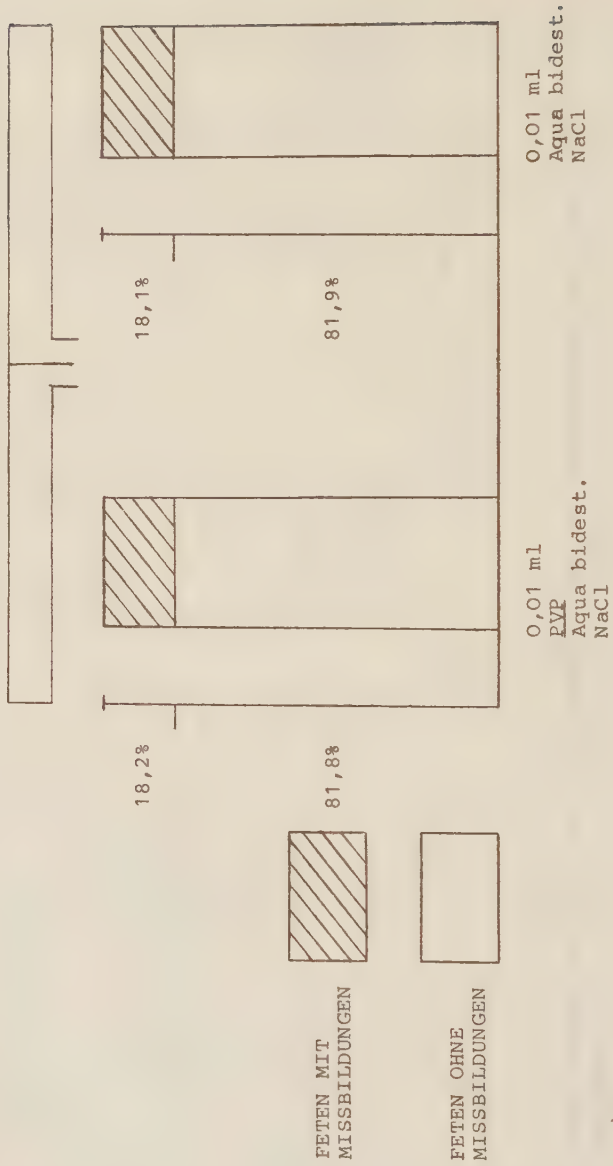


Abbildung 21: Prozentuale Verteilung der Resorptionen und der lebenden Feten nach Testung von Doxycyclin mit der Dottersackmethode bei Kaninchen (Serie III).

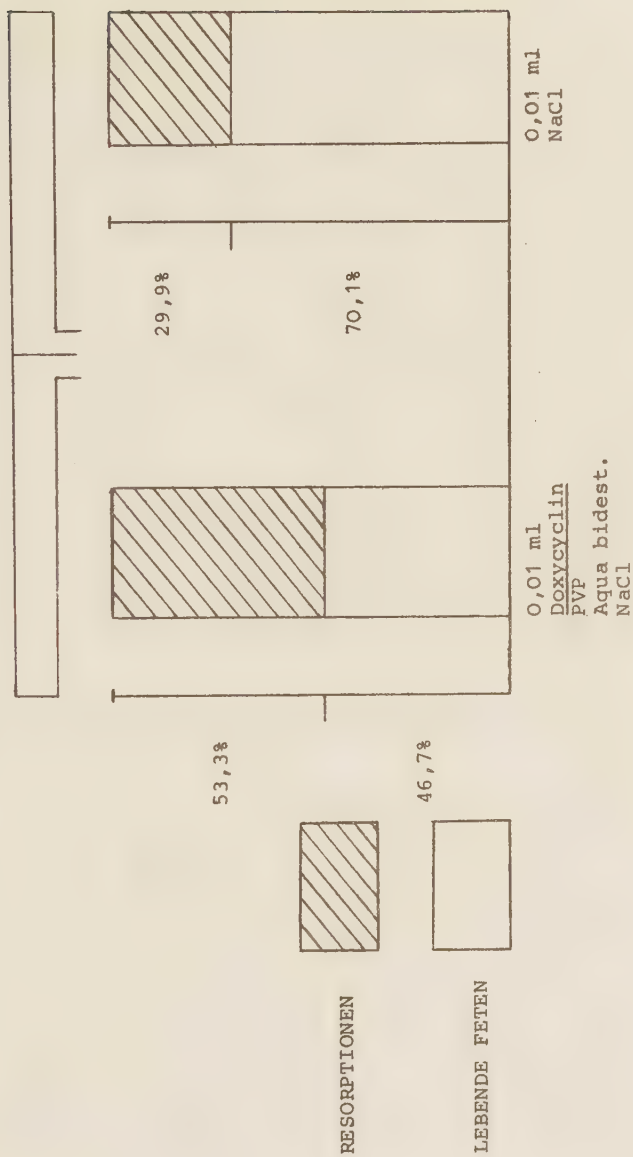
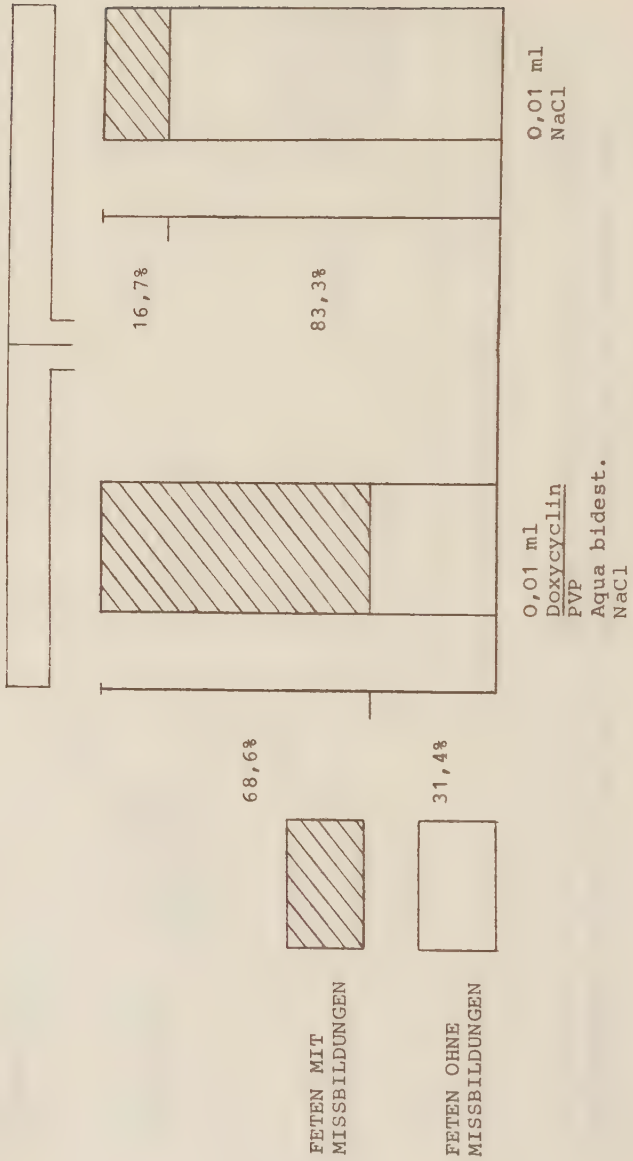


Abbildung 22: Prozentuale Verteilung der Feten ohne Mißbildungen und der Feten mit Mißbildungen nach Testung von Doxycyclin mit der Dottersackmethode bei Kaninchen (Serie III).



6. DISKUSSION

Durch Anwendung der Dottersackmethode wurden in den durchgeführten Versuchsserien die einzelnen Komponenten von Vibravenös selektiv auf Teratogenität getestet. Aufgrund dieses Vorgehens sind Aussagen über die teratogenen Wirkungen von Doxycyclin, PVP und physiologischer Kochsalzlösung möglich.

PVP (Versuchsserie II), in den Dottersack injiziert, verursachte trotz der hohen Dosis von 0,5 mg/Dottersack keine Mißbildungen. Dieses Ergebnis macht deutlich, daß auch relativ hohe Dosen einer Substanz, direkt in den Dottersack appliziert, keine teratogenen Wirkungen zeigen müssen.

Offen bleibt in diesem Zusammenhang die Frage, ob PVP in die Zellen des Embryos eindringt oder ob diese Substanz im Extrazellulärraum bzw. im Dottersack liegen bleibt.

Für PVP ergaben sich in der vorliegenden Literatur keinerlei Hinweise auf Teratogenität. PVP ist nicht plazentargängig (STUKI, 1973). Periston, welches PVP enthält, wurde als bedenklich in der Therapie angesehen, da ein Abbau der Kollidonmoleküle nicht festgestellt werden konnte, und eine Speicherung im Retikuloendothelialen System beobachtet wurde.

Wie jedoch mit histochemischen und elektronenoptischen Methoden nachgewiesen wurde, sind Kumulationen in den früher beschriebenen Ausmaßen nicht exakt feststellbar (SEIFART, 1967). In den letzten Jahren stieg die Bedeutung von PVP durch seine Verwendung als Vehikel- oder Retardsubstanz für Hormone und Medikamente (WESSEL et al., 1971). In Vibravenös dient PVP als Lösungsvermitt-

ler. Nach Angaben der Pfizer GmbH, Karlsruhe, besitzt dieses PVP ein mittleres Molekulargewicht von 11.500.

Da PVP in der vorliegenden Versuchsanordnung keine Mißbildungen verursachte, muß die in Serie III beobachtete teratogene Wirkung auf Doxycyclin zurückgeführt werden. Der sehr geringe Magnesiumanteil bleibt hierbei unberücksichtigt.

Neben dem Parameter Mißbildungen muß auch die Resorption als wesentliches Kennzeichen einer teratogenen Wirkung gewertet werden. Nach GOTTSCHESKI (1965) muß jeder abgestorbene oder in Resorption begriffene Keim als mißgebildet angesehen werden.

Durch Testung verschiedener Einflußgrößen, wie z.B. der Einstich in den Dottersack oder die venöse Stauung im Keimanlagenbereich, konnte CLAUSSEN (1975) einige Ursachen für die relativ hohen Mißbildungsfrequenzen und Resorptionsraten in den Kontrollen bei CLAUSSEN und BROEDERDORFF (1974), bestimmen. Für die Mißbildungs- und Resorptionsentstehung konnten eine venöse Stauung und postoperative Entzündungen und Infektionen verantwortlich gemacht werden. Der Einstich allein erwies sich als nicht teratogen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die oben genannten Faktoren vermieden. Die Mißbildungsfrequenz und die Resorptionsrate waren dennoch recht hoch (s. 5. Versuchsergebnisse). Als Ursache dafür kommen die Äther-Narkose mit ihrer Kreislaufwirkung, die Operation mit der Hypothermie im Operationsbereich und Stresssituationen (z.B. Transport vom Zucht- in den Institutsstall) in Frage. Hinzu kommen noch die spontan auftretenden Mißbildungen und Resorptionen.

WAGNER bestimmte 1972 für Weiße Neuseeländer aus der

Zucht Kostrop eine spontane Resorptionsrate von 5,4 % und eine Mißbildungsfrequenz von 3,4 %. Diese Werte wurden allerdings an einer Stichprobe von nur 10 Kaninchen ermittelt.

Die in den durchgeführten Versuchsserien (I, II und III) aufgetretenen Wirbel-Mißbildungen sind hauptsächlich in der unteren Brustwirbelsäule und oberen Lenden-Wirbelsäule zu finden. Da zum Zeitpunkt der Behandlung der Kaninchen ungefähr 18 Ursegmente ausgebildet sind (GOTTSCHEWSKI und ZIMMERMANN, 1973), kann aus der Lokalisation der beobachteten Fehldifferenzierungen der Wirbelsäule geschlossen werden, daß nach Ausbildung der Somiten die Wirbelsäule für diesen Bereich ihre sensible Phase durchlaufen hat.

Die Tatsache, daß die negative Korrelation zwischen Gewicht und Wurfgröße in Serie I signifikant ist (Abb. 16), und keine Signifikanz zwischen SSL und Anzahl der lebenden Feten auftritt, läßt sich möglicherweise durch ernährungsbedingte Faktoren im Uterus erklären. Das läßt vermuten, daß das Längenwachstum während der intrauterinen Entwicklung weniger durch ernährungsbedingte sondern eher durch genetische Faktoren beeinflusst ist.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen RÖHRBORN und VOGEL (1969) bei Untersuchungen an Mäusen. Zwischen dem Gewicht der Jungtiere und der Wurfgröße bestand ein negativer Zusammenhang.

BARR et al. (1969) untersuchten eine Abhängigkeit des fetalen Gewichtes in Bezug auf die Lage des Keims im Uterus bei der Ratte. Sie stellten fest, daß die Feten, die sich in der Nähe der Bifurkationsstelle des Uterus duplex entwickelten, im Vergleich zu allen übrigen Feten ein höheres Gewicht aufwiesen. Sie brachten diese Beobach-

tung mit hämodynamischen Faktoren in Zusammenhang. Die Durchblutung des Uterus ist in Bifurkationsnähe am stärksten ausgeprägt. Durch die bessere Blutversorgung der Feten ist eine gute, gleichmäßige Nahrungszufuhr gesichert. Es kann daher angenommen werden, daß eine gute Blutversorgung und demgemäß eine gute Nahrungszufuhr für den einzelnen Feten bei einer geringen Wurfgröße eher gewährleistet ist.

GROTE und MICAH (1971) untersuchten die Teratogenität von Pyrrolidino-methyl-tetracyclin, welches sich in seiner chemischen Struktur durch den Pyrrolidin-Ring stark von den übrigen Tetracyclinen unterscheidet (Abb. 23).

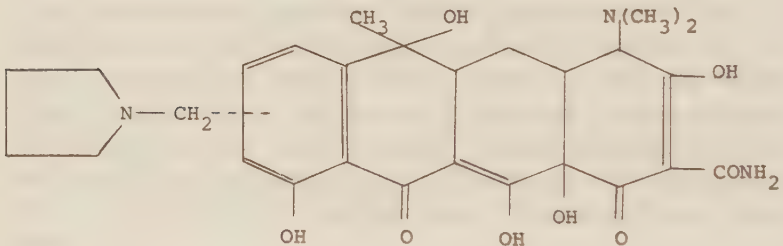


Abbildung 23: Strukturformel von Pyrrolidino-methyl-tetracyclin (Mol. Gew. 527,59).

Sie konnten keine teratogenen Wirkungen feststellen.

Für weitere Erkenntnisse über die Wirkung von Pharmaka auf den Embryo wäre es interessant, mit der Dottersackmethode auch diese Substanz zu untersuchen, um zu sehen, inwieweit die mit Doxycyclin erhaltenen Ergebnisse durch die veränderte Molekularstruktur (Pyrrolidin-Ring, Fehlen

der Hydroxylgruppe an C₅, zusätzliche Hydroxylgruppe an C₆) beeinflußt werden. Der Pyrrolidin-Ring dieses Tetracyclins weist zudem Ähnlichkeiten mit dem Grundgerüst des PVP auf.

Teratologische Untersuchungen mit Doxycyclin waren gemäß den Richtlinien der Food and Drug Administration bei Ratten und Kaninchen bereits durchgeführt worden (WINKLER und WEIH, 1967). Es hatten sich keine substanzbedingten kongenitalen Mißbildungen gezeigt. Auch bei einigen Affen, bei denen Untersuchungen über die chronische Toxizität vorgenommen wurden, hatte Doxycyclin in Dosen von 1 - 25 mg/kg keinerlei teratogene Wirkung.

Im Gegensatz zu den von WINKLER und WEIH zitierten Untersuchungen, wurden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nach direkter Applikation am Embryo erhalten. Aufgrund der untereinander bestehenden Ähnlichkeit in der frühen Ontogenese von Säugerembryonen, sind Extrapolationen dieser Ergebnisse auf den menschlichen Embryo möglich.

Somit zeigt diese Arbeit, daß mit einer teratogenen Wirkung der Tetracycline dann gerechnet werden kann, wenn den menschlichen Embryo eine zu den durchgeführten Untersuchungen vergleichbare Tetracyclindosis erreicht.

7. Z U S A M M E N F A S S U N G

In der vorliegenden Arbeit wurden Doxycyclin, Polyvinylpyrrolidon und physiologische Kochsalzlösung mit der Dottersackmethode auf Teratogenität untersucht.

Dazu wurden Kaninchen (Weiße Neuseeländer) am 9. Tag der Gestation in einer Äther-Sauerstoff-Narkose laparotomiert. In die Keimanlagen (Dottersack) der einen Seite des Uterus duplex wurde die zu untersuchende Substanz injiziert und zur Kontrolle auf der anderen Seite das entsprechende Lösungsmittel. Am 28. Tag der Gestation wurden die Muttertiere getötet, der Uterus entnommen und eröffnet. Die Resorptionen wurden registriert. Danach wurden die lebenden Feten gewogen und präpariert, wobei auf Mißbildungen geachtet wurde. Anschließend wurde die Scheitel-Steiß-Länge gemessen.

Versuchsserie I:

In die Keimanlagen (Dottersack) beider Seiten des Uterus duplex wurde 0,01 ml physiologische Kochsalzlösung injiziert.

Versuchsserie II:

In die Keimanlagen (Dottersack) einer Seite des Uterus duplex wurde Polyvinylpyrrolidon (PVP), aufgelöst in physiologischer Kochsalzlösung und Aqua bidest. (4 : 1), injiziert. Die applizierte Gesamtmenge betrug wie auch in den anderen Versuchsserien 0,01 ml. Darin waren 0,5 mg PVP enthalten.

Zum Vergleich wurden auf der anderen Seite des Uterus 0,01 ml physiologische Kochsalzlösung und Aqua bidest. im Verhältnis 4 : 1 injiziert (Kontrolle bei exakt demselben Muttertier).

Versuchsserie III:

In die Keimanlagen (Dottersack) einer Seite des Uterus duplex wurde Vibravenös mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt injiziert. In 0,01 ml applizierter Flüssigkeitsmenge waren zusätzlich zu Versuchsserie II 0,05 mg Doxycyclin und ungefähr 0,006 mg Magnesium enthalten. Entsprechend der Serie II waren noch 0,5 mg PVP in der Lösung. Das Mengenverhältnis von physiologischer Kochsalzlösung zu dem in Vibravenös enthaltenen Aqua bidest. betrug ebenfalls 4 : 1.

Auf der anderen Seite des Uterus wurde zum Vergleich 0,01 ml physiologische Kochsalzlösung injiziert.

Die Resorptionsrate und die Mißbildungsfrequenz waren in Versuchsserie III auf der Doxycyclin-Seite signifikant erhöht ($P = 0,05$). Da sich PVP als nicht embryotoxisch erwies (Versuchsserie II), und der geringe Magnesiumanteil in Serie III als nicht teratogen angesehen wurde, ist die beobachtete teratoge Wirkung auf Doxycyclin zurückzuführen.

8. L I T E R A T U R

- ALBERT, A.: Avidity of terramycin and aureomycin for metallic cations. Nature (London) 172: 201 (1953)
- ANONYMUS: Ledermycin, Breitspektrum-Antibiotikum
Novalis Arzneimittel, Cyanamid GMBH
München
- ARNEIL, G.C.: Tetracycline and congenital limb abnormalities. Brit. Med. J. 2: 544-545 (1962)
- BARR, M., R.P. JENSH and R.L. BRENT: Fetal weight and intrauterine position in rats. Teratology 2: 241-246 (1969)
- BEVELANDER, G. and S.Q. COHLAN: The effect on the rat fetus of transplacentally acquired tetracycline. Biol. Neonat. 4: 365-370 (1962)
- BEVELANDER, G., L. GOLDBERG and H. NAKAHARA: The effect of tetracycline on skeletal development in the larval sand dollar (*Echinarrachnius parma*). Arch. Oral Biol. 2: 127-130 (1960)
- BEVELANDER, G., H. NAKAHARA and G.K. ROLLE: Inhibition of skeletal formation in the chick embryo following administration of tetracycline. Nature (London) 184: 728-729 (1959)
- BEVELANDER, G., H. NAKAHARA and G.K. ROLLE: The effect of tetracycline on the development of the skeletal system of the chick embryo. Dev. Biol. 2: 298-312 (1960)

- BOUCHER, D. et P. CARTERET: Action du chlorhydrate de tétracycline, injecté à la mère au cours de la gestation sur la croissance somatique des descendants. J. Physiol. (Paris) 57: 567 (1965)
- CAHEN, R.L.: Evaluation of the teratogenicity of drugs. Clin. Pharmacol. Ther. 5: 480-514 (1964)
- CAHEN, R. et A. FAVE: Y a-t-il une relation entre l'effet tératogène et le passage transplacentaire d'un médicament? C.R. Soc. Biol. (Paris) 164: 610-616 (1970)
- CARTER, M.P.: Tetracycline and congenital limb abnormalities. Brit. Med. J. 2: 544 (1962)
- CARTER, M.P. and F. WILSON: Tetracycline and congenital limb abnormalities. Brit. Med. J. 2: 407-408 (1962)
- CHAMBERLAIN, J.G. and M.E. GOLDYNE: Intra-amniotic injection of pyridine nucleotides or adenosine triphosphate as countertherapie for 6-aminonicotinamide (6-AN) teratogenesis. Teratology 3: 11-16 (1970)
- CLAUSSEN, U.: Zur Methode der Applikation in den Dottersack bei teratologischen Untersuchungen an Kaninchen. Arzneim. Forsch. 25: 1434 - 1436 (1975)
- CLAUSSEN, U. und C.D. BROEDERSDORFF: Zur teratogenen Wirkung von 6-Amino-nicotinsäureamid bei Kaninchen nach Injektion in den Dottersack. Z. Anat. Entwicklungsgesch. 145: 67-73 (1974)

- COHLAN, S.Q., G. BEVELANDER and S. BROSS: Effect of tetracycline on bone growth in the premature infant. Proc. 1st Intersci. Conf. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, New York, 340-347 (1961)
- COHLAN, S.Q., G. BEVELANDER and T. TIAMSIC: Growth inhibition of prematures receiving tetracycline. Am. J. Dis. Child. 105: 453-461 (1963)
- DEGENHARDT, K.H.: Durch O₂-Mangel induzierte Fehlbildungen der Axialgradienten bei Kaninchen. Z. Naturforsch. 9b: 530-536 (1954)
- DEGENHARDT, K.H.: Beobachtungen zur Phasenspezifität O₂-Mangel induzierter Wirbelsäulenfehlbildungen bei Kaninchen. Acta genet. (Basel) 6: 246-252 (1956)
- DEGENHARDT, K.H.: Die genetische und morphologische Analyse spezieller Entwicklungsstörungen in einem Stamm ingezüchteter Hermelin-Kaninchen. Verl. d. akad. wiss. Lit. Abhandlung 12, Mainz (1960)
- DETYUK, E.S., I.A. VDOVICHENKO and G.A. KARTYSH: Tetracycline effect on embryogenesis of albino rats. Antibiotiki 16: 923-926 (1971)
- DIDCOCK, K., D. JACKSON and J.M. ROBSON: The action of some nucleotoxic substances on pregnancy. Brit. J. Pharmacol. 11: 437-441 (1956)
- DOSTAL, M.: Morphogenesis of cleft palate induced by exogenous factors. III. Intraamniotic application of hydrocortisone in mice. Teratology 4: 63-68 (1970)

- DUGGAR, B.M.: Aureomycin: product of continuing search for new antibiotics. Ann. N.Y. Acad. Sci. 51: 177-181 (1948)
- DUNAJ, W.: The influence of some tetracycline antibiotics on the processes of ossification of the long bones in human embryos (microscopic examination). Chir. Narzadow Ruchu Ortop. Pol. 39: 205-210 (1974)
- EGER, W., H. KÄMMERER und G. BOTHMANN: Experimentelle Beiträge zur Tetrazyklinablagerung in den Zähnen. Dtsch. Zahnärztl. Z. 20: 829-839 (1965)
- ERIKSSON, M., C.S. CATZ and S.J. YAFFE: Drugs and pregnancy. Clin. Obstet. Gynecol. 16: 199-224 (1973)
- FILIPPI, B. e V. MELA: Malformazioni congenite e degli arti da tetraciclina. Minerva Chir. 12: 1106-1110 (1957)
- FOZZARD, C.E.: Tetracycline and congenital limb abnormalities. Brit. Med. J. 2: 729 (1962)
- GOTTSCHESKI, G.H.M.: Können Tierversuche zur Lösung der Frage nach der teratogenen Wirkung von Medikamenten auf den menschlichen Embryo beitragen? Arzneim. Forsch. 15: 97-104 (1965)
- GOTTSCHESKI, G.H.M. und W. ZIMMERMANN: Die Embryonalentwicklung des Hauskaninchens, Normogenese und Teratogenese. M.&H. Schaper, Hannover (1973)

- GROTE, W.: Störungen der Embryonalentwicklung bei erhöhtem CO₂- und O₂-Partialdruck und bei Unterdruck. Z. Morphol. Anthropol. 56: 165-194 (1965)
- GROTE, W.: Mißbildungen des Rumpfskeletts nach mütterlichem Blutverlust bei Kaninchen. Z. Anat. Entwicklungsgesch. 128: 66-74 (1969)
- GROTE, W.: Grundlegende Erkenntnisse der experimentellen und vergleichenden Teratologie. Ringelheimer Biologische Umschau, Heft 3, 1971
- GROTE, W. und F. MICAH: Tierexperimentelle Untersuchungen zur Frage der Teratogenität von Tetracyclin. Arzneim. Forsch. 21: 683-685 (1971)
- HALME, J. and J. Aer: Effect of tetracycline on synthesis of collagen and incorporation of calcium into bone in foetal and pregnant rats. Biochem. Pharmacol. 17: 1479-1484 (1968)
- HARCOURT, J.K., N.W. JOHNSON and E. STOREY: In vivo incorporation of tetracycline in the teeth of man. Arch. Oral Biol. 7: 431-437 (1962)
- HLAVKA, J.J. and J.H. BOOTH: The tetracyclines. Arzneim. Forsch. 17: 210-240 (1973)
- HOBBY, G.L., T.F. LENERT, D. PIKULA, M. KISELUK and M.E. HUDDERS: The antimicrobial action of terramycin. Ann. N.Y. Acad. Sci. 53: 266-276 (1950)

- HURLEY, L.S. and H. TUCHMANN-DUPLESSIS: Influence of tetracycline on pre- and postnatal development in the rat. C.R. Acad. Sci. 257: 302-304 (1963)
- JOHNSON, R.H.: The tetracyclines: A review of the literature- 1948 through 1963. I. Oral Ther. Pharma col. 1: 190-217 (1964)
- KAITILA, I.: Effect of tetracycline on mineralization in cycloheximide-treated-bones in vitro. Calcif. Tissue Res. 7: 46-57 (1971)
- KIRYUSCHENKOV, A.P. and A.M. SKOSYREVA: The effect of tetracycline on the embryonic development. Akush. Ginekol. (Mosk) 48: 46-51 (1972)
- KNOTHE, H.: Mikrobiologische Grundlagen der Chemotherapie. in: Antibiotika, ein Leitfaden für die Therapie in Praxis und Klinik. Hrsg. von R. Frey, 2. Auflage, Aesopus Verlag 1974
- KRESHOVER, S.J.: Prenatal factors in oral pathologic conditions. Oral Surg. 13: 569-577 (1960)
- KUSCHINSKY, G. und H. LÜLLMANN: Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie. 6. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart (1974)
- LAW, L.W.: The production of tumors by injection of a carcinogen into the amniotic fluid of mice. Science 91: 96-97 (1940)
- MASON, S.: Tetracycline in teeth and bones. Brit. Med. J. 2: 729 (1962)

- McCOLL, J.D., M. GLOBUS and S. ROBINSON: Effect of some therapeutic agents on the developing rat fetus. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 7: 409-417 (1965)
- MENNIE, A.T.: Tetracycline and congenital limb abnormalities. *Brit. Med. J.* 2: 480 (1962)
- MILCH, R.A., D.P. RALL and J.E. TOBIE: Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone. *J. Bone Joint Surg.* 40A: 897-910 (1958)
- MIRKIN, B.L.: Maternal and fetal distribution of drugs in pregnancy. *Clin. Pharmacol. Ther.* 14: 643-647 (1973)
- MOYNAHAN, E.J.: Tetracycline in teeth and bone. *Lancet* 1962 I: 969-970
- NETTER, K.J.: Arzneimittelaufnahme und -abbau während der Fetalperiode. *Verhandlungen der deutschen Gesellschaft für Gynäkologie, Arch. Gynäkol.* 211: 112-133 (1971)
- OWEN, J.J.T.: Localisation of tetracycline in bone. *Lancet* 1962 I: 780-781
- PERRIN, D.D.: Binding of tetracyclines to bone. *Nature (London)* 208: 787-788 (1965)
- RÖHRBORN, G. and F. VOGEL: A search for dominant mutations in F₁ progeny of male mice treated with trenimone (triethyleneiminobenzoquinone - 1,4). *Humangenetik* 7: 43-50 (1969)
- SALTZMAN, A.: Fluorophotometric estimation of aureomycin in blood and urine. *J. Lab. Clin. Med.* 35: 123-128 (1950)

- SAVINI, E.C., M.A. MOULIN et M.F.J. HERROU: Effets tératogènes de l'oxytétracycline. *Thérapie* 23: 1247-1260 (1968)
- SCOTT, W.J.: Effects of intrauterine administration of acetazolamide in rats. *Teratology* 3: 261-268 (1970)
- SCHRÖR, K.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie einiger Antibiotika. *in*: Antibiotika, ein Leitfaden für die Therapie in Praxis und Klinik. Hrsg. von R. Frey, 2. Auflage, Aesopus Verlag 1974
- SCHWALBE, E.: Die Morphologie der Mißbildungen des Menschen und der Tiere. 1. Teil, G. Fischer, Jena 1906
- SEIDEL, F.: Die Entwicklungsfähigkeiten isolierter Furchungszellen aus dem Ei des Kaninchens. Roux' Arch. Entw. mech. Org. 152: 43-130 (1960)
- SEIFART, W.: Über die pathophysiologischen Grundlagen der Infusionsbehandlung beim Schock. Z. Ärztl Fortbild. 61: 1-9 (1967)
- SOMERS, G.F.: zitiert nach: CAHEN, R.L.: Evaluation of the teratogenicity of drugs. Clin. Pharmacol. Ther. 5: 480-514 (1964)
- STORCH, T.G. and W.M. Layton: Teratogenic effects of intrauterine injection of acetazolamide and amiloride in hamsters. *Teratology* 7: 209-214 (1973)
- STOREY, E.: Tetracycline antibiotics and their effects on calcified and non calcified tissues. Australasian Ann. Med. 12: 325-332 (1963)

- STRAUSS, L., N. GOLDENBERG, K. HIROTA and Y. OKUDAIRA:
Structure of the human placenta. Proceedings of the symposium on the placenta, its form and functions; Birth Defects Original Articles Series, vol 1, National Foundation-March of Dimes, Washington, D.C., 1965
- STUKI, D.: Le placenta, cet inconnu. Praxis 62: 69-77 (1973)
- SZUMIGOWSKA-SZRAJBER, G. and J. JESKE: Influence of some tetracyclines on reproductiveness of rats. Acta Pol. Pharm. 30: 95-101 (1973)
- THEILER, K.: Das Wirbel-Rippen-Syndrom. Schweiz. Med. Wochenschr. 98: 907-908 (1968)
- TÖTTERMANN, L.E. and L. SAXEN: Incorporation of tetracyclines into human foetal bones after maternal drug administration. Acta Obst. Gyn. Scand. 48: 542-549 (1969)
- TRASLER, D.G., B.E. WALKER and F.C. FRASER: Congenital malformations produced by amniotic-sac puncture. Science 124: 439 (1956)
- TUBARO, E.: Possible relationship between tetracycline stability and effect on foetal skeleton. Brit. J. Pharmacol. 23: 445-448 (1964)
- TURBOW, M.M. and J.G. CHAMBERLAIN: Direct effects of 6-aminonicotinamide on the developing rat embryo in vitro and in vivo. Teratology 1: 103-108 (1968)

- TURBOW, M.M., W.H. CLARK and J.A. DIPAOLO: Embryonic abnormalities in hamsters following intra-uterine injection of 6-aminonicotinamide. *Teratology* 4: 427-432 (1971)
- WAGNER, W.D.: Fehlbildungen bei Kaninchen nach hyperbarer Oxygenation. Diss. Med. Fak. Düsseldorf (1972)
- WEINMANN, G. und W. BRAUN: Katamnestische Untersuchungen tetrazyklinbehandelter Frühgeborener zur Frage von Wachstumsstörungen und Zahnveränderungen. *Kinderärztl. Prax.* 37: 105-109 (1969)
- WESSEL, W., M. SCHOOG and E. WINKLER: Polyvinylpyrrolidone (PVP), its diagnostic, therapeutic and technical application and consequences thereof. *Arzneim. Forsch.* 21: 1468-1482 (1971)
- WILSON, F.: Congenital defects in the newborn. *Brit. Med. J.* 2: 255 (1962)
- WINKLER, E. und H. WEIH: Doxycyclin, Ergebnisse von Basisuntersuchungen. *Med. Klin.* 62: 1257-1262 (1967)

Herrn Prof. Dr. G. R ö h r b o r n und Herrn
Prof. Dr. W. G r o t e danke ich für die Über-
lassung des Themas und für ihre Hilfe bei
der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. U. C l a u s s e n danke ich für
seine wertvolle Unterstützung und stete Dis-
kussionsbereitschaft.

LEBENS LAUF

Am 13. März 1954 wurde ich als jüngstes Kind des Installateurmeisters Wilhelm Breuer und seiner Ehefrau Christine, geborene Jordans, in Eschweiler geboren. Ich habe zwei Schwestern.

Ostern 1960 wurde ich in die katholische Volksschule Eschweiler Hehlrather Straße eingeschult. Nach vier Volksschuljahren wechselte ich Ostern 1964 zum Städtischen Naturwissenschaftlichen Gymnasium Eschweiler über. Hier legte ich im Mai 1972 die Reifeprüfung ab.

Nach Ableistung eines Teils meines Wehrdienstes im Sanitätskorps der Bundeswehr, begann ich im Sommersemester 1973 das Medizinstudium an der Universität Düsseldorf und bestand hier im Wintersemester 1974 die ärztliche Vorprüfung.

Im Mai 1974 begann ich im Institut für Humangenetik und Anthropologie der Universität Düsseldorf mit teratologischen Untersuchungen bei Kaninchen.

